



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOLFENAMİK ASİTİN İNSAN LNCaP PROSTAT KANSER HÜCRE DİZİSİ
ÜZERİNDEKİ OLASI ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RIFAT ERTEKİN

DANIŞMAN

Prof.Dr. Selda KABADERE

2016



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOLFENAMİK ASİTİN İNSAN LNCaP PROSTAT KANSER HÜCRE DİZİSİ
ÜZERİNDEKİ OLASI ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RIFAT ERTEKİN

DANIŞMAN


Prof.Dr. SELDA KABADERE


KABUL VE ONAY SAYFASI

Rıfat Ertekin'in Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Tolfenamik asitin insan Inçap prostat kanser hücre dizisi üzerindeki olası antiproliferatif etkisinin araştırılması"başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih

19 / 12 / 2016

Üye: Prof. Dr. Ruki UYAR 

Üye: Prof. Dr. Yaxemir Aydın 

Üye: Prof. Dr. Nilüfer Erbaş 

Üye: Prof. Dr. Selda Kabadere 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Gökhan Keleş 

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22 / 12 / 2016 tarih ve 1113 / 532 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü 

Özet

Prostat kanseri Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerindedir. Günümüzdeki tedavi yöntemleri, prostat kanserinin tedavisi için yeni ve etkin olabilecek yöntem ve kimyasalların arayış çabalarını zorunlu kılmaktadır. Tolfenamik asit (TA) non-steroid antiinflamatuvar bir ilaçtır ve son yıllarda yapılan çalışmalarda pankreas, özefagus, akciğer gibi kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Bu araştırmanın amacı, androjen duyarlı insan prostat kanser hücre dizisinde (LNCaP) ve glioma hücrelerinde (T-98G) TA’nın, hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkisini belirlemektir. Çalışmamızda T-98G ve LNCaP hücre dizileri üzerine TA’nın 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM’lık dozları 24 ve 48 saat süreyle uygulandı ve ardından MTT testi ile hücre canlılığı belirlendi. Etkili bulunan dozlar akım sitometri ve real time PCR teknikleri ile değerlendirildi. T-98G hücrelerinde TA’nın söz konusu dozlarının 24 ve 48 saatte herhangi bir etkisi saptanamadı. Bu nedenle T-98G hücreleri akım sitometri ve RT-PCR ile incelenmedi. LNCaP hücrelerine 24 saat süreyle 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA dozları uygulandığında yaşayan hücre oranları sırasıyla %91, %83, %82, %76, %61 ve %49 olarak hesaplandı. 48 saatte ise aynı TA dozlarında elde edilen yaşam oranları sırasıyla %90, %83, %82, %78, %52 ve %47 oldu. LNCaP hücrelerinde 24 saatte 25, 50 ve 100 µM TA uygulaması sonucu elde edilen erken apoptotik değerler (kontrol %0.60), %2, %4 ve %17 iken 48 saatte (kontrol %0.48) %10, %10 ve %64 olarak bulundu. TA doz ve zamana bağlı olarak LNCaP hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır. PCR sonuçlarına göre TA, kaspaz-9 düzeyinde, gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark oluşturmadı. Bununla birlikte 50 µM TA grubunda kaspaz-9 aktivitesinin kontrol grubuna göre katlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç artan TA konsantrasyonuna bağlı olarak apoptozun arttığını göstermektedir. Çalışmamızda 25, 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda siklooksijenaz-2 (COX-2) kontrol grubuna göre katlı olarak azalmıştır. Kanser oluşumunda ya da yayılmasında COX-2 yolaklarının aşırı uyarılması göz önüne alındığında, çalışmamızda TA’nın ilk kez kanserli LNCaP hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı etkilerinin tespit edilmesi önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Tolfenamik asit, prostat kanseri, LNCaP, apoptoz, MTT.

Summary

Prostate Cancer is among the most frequently observed type of cancers in Turkey. Contemporary treatment modalities require that new and effective methods or chemicals should be developed. Tolfenamic acid (TA) is a nonsteroidal anti-inflammatory medicine that recently reported to stimulate apoptosis in cancer cells, such as pancreas, oesophagus and lungs. The present study aims to determine the role of TA on cell viability and apoptosis in glioma cells (T-98G) and androgen-sensitive human prostate cancer cell line (LNCaP). In our study, 1, 5, 10, 25, 50, and 100 μM doses of TA were applied to T-98G and LNCaP cell lines for periods of 24 and 48 hours. Subsequent cell vitality was tested with MTT test. The effective doses were then analysed by flow cytometry and real-time PCR techniques. Upon MTT spectrophotometric tests aforementioned doses exhibited no significant effect on the survival rate of T-98G cells in 24 and 48 hours. Therefore, T-98G cells did not need to be analysed by flow cytometry and RT-PCR. When LNCaP cells were exposed to 1, 5, 10, 25, 50 and 100 μM doses of TA for 24 hours, the rates of living cells were determined as 91%, 83%, 82%, 76%, 61%, and 49%, respectively. When, the same doses were applied for 48 hours, the living cell rates were 90%, 83%, 82%, 78%, 52%, and 47%, respectively. Following applications of 25, 50 and 100 μM TA to LNCaP cells for 24 hours, the apoptotic values (0.60% for the control group) were found to be 2%, 4%, and 17%, whereas the values for 48 hours were 10%, 10% and 64% (0.48% for the control group), respectively. TA induced apoptosis of LNCaP cells depending on the dose and duration of exposure.

According to PCR results, TA showed no statistical significance among the groups at caspase-9 level, but caspase-9 activity increased incrementally in groups given 50 μM of TA. The increase in the apoptosis of LNCaP cells can be attributed to the rising amount of TA concentration. In our study, in 25, 50, and 100 μM TA groups, cyclooxygenase-2 (COX-2) decreased incrementally when compared to the control group. Considering the overstimulation of COX-2 paths in the emergence of cancer or in metastasis, the present study indicates that TA has an antiproliferative effect and a stimulating effect on apoptosis of LNCaP cells depending on the dose and duration of exposure.

Key words: Tolfenamic acid, prostate cancer, LNCaP, apoptosis, MTT.

İçindekiler

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLO DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Prostat Bezi	4
2.2. Prostat Kanseri.....	5
2.3. Hormonal Etkiler.....	5
2.3.1. Androjenler	5
2.3.2. Prostata özel antijen.....	6
2.4. Genetik Faktörler	6
2.5. Prostat Kanseri Tedavi Modelleri	7
2.5.1. İkincil hormonal tedaviler	7
2.5.2. Kemoterapi uygulamaları	7
2.6. Prostat Kanserinin Klinik Özellikleri	8
2.7. Prostat Kanserinin Patolojik Özellikleri	9
2.8. Kanser ve Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri	9
2.9. Siklooksijenazlar.....	10
2.10. Kanserli Hücrelerin Apoptoza Gidememesi.....	12
2.11. Apoptoz Mekanizmaları	13
2.11.1. Kaspazlar aracılığıyla hücre ölümü	13
2.11.2. Ölüm sinyalleri aracılığıyla hücre ölümü.....	15
2.12. Glioma	16
2.13. Tolfenamik Asit.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Hücre kültürünün yapılması.....	19
3.2. Kültür için yapılan hazırlıklar	19
3.3. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması	19
3.4. Deney grupları I	19
3.5. Hücre canlılığını ve apoptozu belirleme yöntemleri	20
3.5.1. MTT yöntemi ile hücre canlılığını belirleme.....	20
3.5.2. Apoptoz ölçümü (Flow sitometrik yöntem).....	20
3.5.3. Real Time-PCR (RT-PCR) tekniği	21
3.6. İstatistiksel analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. İlaçların Hücre Canlılığına Etkileri.....	24
4.1.1. MTT yöntemi bulguları	24
4.1.1.1. Tolfenamik asitin T-98G hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması	24

4.1.1.2. Tolfenamik asitin LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması	24
4.2. Tolfenamik asitin LNCaP hücrelerindeki apoptoz üzerine etkileri	25
4.3. PCR Sonuçları.....	28
4.3.1. Kaspaz-9 aktivitesi	28
4.3.2. Siklooksijenaz-2 aktivitesi	29
5.TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	35
ÖZGEÇMİŞ.....	47



Tablo Dizini

Tablo 1. RT-PCR için miks içeriği.....	22
Tablo 4.2.1. Tolfenamik asit ile 24 saat muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	25
Tablo 4.2.2. Tolfenamik asit ile 48 saat muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	26
Tablo 4.3.1.1. Tolfenamik asit ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen kaspaz-9 sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	29
Tablo 4.3.2.1. Tolfenamik asit ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen siklooksijenaz-2 sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	29

Şekil Dizini

Şekil 2.1.1. Prostat anatomisinin şematik görünümü.....	4
Şekil 2.9.1. Araşidonik asitten prostaglandinler ve tromboksan sentezi.....	11
Şekil 2.11.1.1 Apoptozda rolü olan proteinler.....	13
Şekil 2.11.1.2. Apoptoz mekanizmasında hücre içinde oluşan bir etki sonucu hücre ölümü.....	15
Şekil 2.11.2.1. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi.....	16
Şekil 2.13.1. Tolfenamik asitin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 4.1.1.1.1 Tolfenamik asitin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM dozlarının 24 ve 48 saat uygulanmasının T-98G hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	24
Şekil 4.1.1.2.1 Tolfenamik asitin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM dozlarının 24 ve 48 saat uygulanmasının LNCaP hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	25
Şekil 4.2.1 (a, b, c, d). Tolfenamik asit dozlarının (kontrol, 25, 50 ve 100 µM) 24 saat uygulanmasının ardından LNCaP hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdelerinin akım sitometri yöntemiyle belirlenmesi.....	27
Şekil 4.2.2 (a, b, c, d). Kanserli LNCaP hücrelerine 48 saat tolfeamik asit (kontrol, 25, 50 ve 100 µM) uygulanması sonrası ortaya çıkan erken apoptotik hücre yüzdeleri.....	28
Şekil 4.3.1.1. Kontrol gurubu ve tolfeamik asit (25, 50 ve 100 µM) gruplarının LNCaP hücrelerinde kaspaz-9 aktivitesi.....	29
Şekil 4.3.2.1. Kontrol gurubu ve tolfeamik asit (25, 50 ve 100 µM) gruplarının LNCaP hücrelerinde siklooksijenaz-2 düzeyi.....	30

Simge ve Kısaltmalar Dizini

TA	:	Tolfenamik asit
LNCaP	:	İnsan prostat kanser hücre dizisi
T-98G	:	İnsan glioma kanser hücre dizisi
μM	:	Mikromolar
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid
PCR	:	<i>Real Time-PCR (RT-PCR) tekniği</i>
COX	:	Siklooksijenaz
PSA	:	Prostat duyarlı (spesifik) antijen
PSMA	:	Prostat duyarlı (spesifik) Membran antijen
DES	:	Dietilstilbestrol
DHT	:	Dihidrotestosterona
LH	:	Lüteinleştirici hormon
NSAİİ	:	Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
DHT	:	Dihidrotestosteron
DHEA	:	Dehidroepiandrosteron
PGG2	:	Prostaglandin G2
TxA2	:	Tromboksan A2
CAD	:	Kaspaz aktive edici deoksiribonukleaz
ICAD	:	Kaspaz aktive edici deoksiribonukleaz inhibitörü
Apaf- 1	:	Apoptozda proteaz aktive edici faktör
TNF	:	Tümör nekroz faktör
Sp	:	Özgünlük protein
DMEM	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
FCS	:	Fetal dana serumu (Fetal calf serum)
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
VEGF	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörünün
VEGFR1	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 1

1. GİRİŞ VE AMAÇ

KontROLSÜZ hücre çoğalması ve normal olmayan hücre tiplerinin oluşumu ile karakterize edilen kanser, 2012 yılında Dünyada toplam 14,1 milyon yeni vakanın yanı sıra 8,2 milyon kişide ölüme neden olan ve görülme sıklığı giderek artan bir hastalıktır (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014; Beytur ve ark., 2011). Farklı tipteki birçok kanser türünü iyileştirecek bir tedavi yöntemi tam olarak geliştirilemediğinden, bu alandaki araştırmalar artarak devam etmektedir (Beytur ve ark., 2011; Koyunoğlu ve ark., 2013). Prostat kanseri Türkiye’de en sık görülen kanser tiplerindendir (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014). İstatistiksel açıdan tüm kanserlerin %32’sini oluşturur. Bu kanser türü, prostat bezindeki hücrelerin çoğalması ve ölümü arasındaki oranın değişerek organ hacminin malign artması olarak ifade edilmektedir (İzmirli, 2010).

Prostat kanseri; genetik yapı, kromozom takımı sayısı, onkogen/tümör baskılayıcı gen ifadesi ve bunların biyolojik etkileri ile moleküler özellikleri açısından oldukça karmaşıktır. Prostat kanserinin erken büyüme aşaması testosterondan 5 α -redüktaz enzim sistemi ile üretilen 5 α -dihidrotestosterona ihtiyaç duyar. Böyle prostat hücreleri androjen bağımlı olarak tanımlanırlar. Daha sonra prostat kanser hücreleri androjene cevap verebilir, fakat büyümek için ona ihtiyaç duymaz. Prostat kanserinin büyümesi için androjene gereksinim duymadıklarından hastaların tümörleri cerrahi müdahale ya da radyoterapi için uygun değildir, prostat kanser hücresinin büyümesini önlemek için ya sürekli ya da aralıklarla hormonal tedavi uygulanabilir (Paul and Breul, 2000; Rambeaud, 1999; Sciarra, 1999). Prostat kanserinin gelişiminde diyet ve hormonal faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Koyunoğlu ve ark., 2013). Yapılan araştırmalara göre testosteron, böbrek üstü bezi veya eksojen androjenler olmadan prostat kanserinin başlayamayacağı bildirilmiştir (Vis and Schroder, 2009). Androjen bağımlı kanserler androjen yokluğunda küçülürken, androjen bağımsız tümörler cerrahi ya da tıbbi kısırlaştırmaya rağmen büyümeye devam etmektedir (Oh, 2000). Bundan dolayı tedavide öncelikle androjen baskılayıcı kürler uygulanırken ilerleyen prostat kanserleri sonrasında en sık uygulanan yöntem androjen baskılayıcıların geri çekilmesidir. Bunun akabinde ikincil hormonal tedaviler ve sitotoksik kemoterapiler uygulanmaktadır (Calabro and Sternberg, 2007).

Prostat kanser hücreleri çeşitli organlara, özellikle de lokal lenf nodlarına ve kemiklere yayılır. Prostat kanser hücreleri tarafından ifade edilen önemli antijenlerden prostat spesifik antijen (PSA) ve prostatik asit fosfataz, prostat kanserli hastaların takibi için kullanılır (Polascik, 1999; Peehl, 1995). Su ve ark., (1995) prostat spesifik membran antijeni (PSMA)’nin prostatın benign (iyi huylu) hiperplazisi ve prostat kanserinde iki ayrı formda üretildiğini göstermişlerdir. PSMA’nın prostat kanserinde normal hücrelerle kıyaslandığında arttığı ve bu artışın hücreler androjen

bağımsız olmaya başlar başlamaz gerçekleştiği bulunmuştur (O'Keefe, 2000; Chang, 2000).

Birçok çalışmada, apoptozdan kaçınma, androjen bağımsız prostat kanserinde en kritik patofizyolojik olaydır (Wang, 2004). Bu yüzden androjen bağımsız prostat kanserinde apoptotik yolların uyarılması, ilerlemiş prostat kanseri için bir tedavi yöntemi olarak önerilmektedir (Tang, 1997; Cho, 2004). Vitamin E, selenyum, fitoöstrojenler ve yeşil çay gibi besin katkı maddelerinin prostat kanserini önlemeye yardımcı olabileceği öne sürülmüştür (Strom, 1999). Klinikte toremifen (Steiner and Pound, 2003), finasterid (Thompson, 2003) ve dutasterid (Andriole, 2004) gibi birçok yeni ilaç prostat kanserinin önlenmesi için denenmektedir. Bu ilaçlarla tedaviler düşük dereceli prostat tümörlerinin gelişimini önleyebilir ancak yüksek dereceli kanserlerin artma riski üzerindeki endişeleri ortadan kaldıramamıştır (Umesh, 2012). Prostat fonksiyonlarının düzenlenmesinden sorumlu tek hormon grubu androjenler değildir (Nalabolu, 2014). Prostat kanserinin tedavisinde dietilstilbestrol (DES), 5- α redüktaz inhibitörleri, lüteinleştirici hormon (LH) agonistleri, LH antagonistleri ve antiandrojen ilaçlar tek tek veya birlikte denenmiştir. Ancak bu ilaçların kullanımı ciddi yan etkileri nedeniyle sınırlıdır (McLeod, 2003; Kordan, 2010). Androjen ablasyon terapisi prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır ancak bu tedaviye başta cevap veren hastalarda sıklıkla agresif androjen bağımsız kanser gelişmektedir (Umesh, 2012). Bu yüzden androjen bağımsız prostat kanserinin üstesinden gelmek için yeni tedavi edici seçeneklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Non-steroid antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) genellikle analjezik, antipiretik ve antiinflatuar olarak kullanılır. Tolfenamik asit (TA) diğer non-steroid antiinflatuar ilaçlardan daha az mide bağırsak sisteminde yan etkilere sahip olduğundan baş ağrısı tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. NSAİİ'nin kanser kemoterapisinde kemoterapötik ajan olarak da kullanılabilirler düşünülmektedir. TA akciğer, özefagus, meme, pankreas ve kolon kanserlerinde antikanser etki gösterdiği saptanmış NSAİİ'dir (Elwood, 2009; Wang and Dubois, 2010; Cuzick, 2009; Satya, 2014). Birçok hayvan modelinde romatoid artrit ve osteoartrit gibi hastalıkların tedavisinde TA'nın ağrı kesici ve ateş düşürücü özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Wankya, 1981).

NSAİİ'nin antiproliferatif özelliklerine apoptotik yollarda ve antianjiojenik aktivitede artışlar eşlik eder (Tarnawski and Jones, 2003; Lincova, 2009). Son çalışmalar TA'nın pankreas, özefagus, akciğer ve ovaryum kanserlerinde antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Konduri, 2009; Papineni, 2009; Colon, 2011). Yapılan çalışmalarda TA'nın ayrıca kolorektal kanser hücrelerinde ve pankreatik kanser modellerinin metastaz ve tümör gelişiminde apoptozu uyardığını ortaya koymuştur (Abdelrahim, 2006(a); Abdelrahim, 2007(b); Lee, 2008). Ancak prostat kanser hücrelerinin apoptozunda TA veya onun moleküler düzeydeki etkisi

hakkında yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır (Choi, 2011). Mitokondriyal hasarda mitokondriyal zar potansiyeli kaybolur ve mitokondriyal iç zar yüzeyinden sitokrom C gibi proteinler salınır. Mitokondrinin doğrudan ya da dolaylı düzensizlikleri apoptotik yolağı uyarabilir. TA'nın mitokondriyal zar potansiyelinin kaybını önemli oranda uyardığı ve böylece TA nedenli apoptozda mitokondriyal zar hasarına karıştığı gösterilmiştir (Sung, 2012).

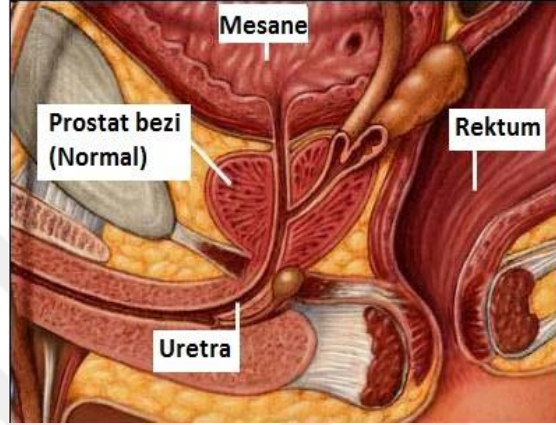
Bu çalışmanın amacı, androjen duyarlı insan prostat kanser hücre dizisinde (LNCaP) TA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemektir. Böylece TA'nın antikanser aktivitesi ile ilişkili mekanizmaların altında yatan süreçleri anlamaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezi

Prostat bezinin gelişimi, 8-12. haftalarda insan koryonik gonadotropinin uyarımı sonucu salgılanan testosteron tarafından gerçekleştirilir. Bu bez doğum anında küçük olup eşeyssel olgunluğa kadar adeta bir dinlenme halindeyken bu aşamadan itibaren büyümeye başlar (Balbay, 2008).



Şekil 2.1.1. Prostat anatomisinin şematik görünümü (Krongrad and Droller, 1993).

Prostat, şekli ceviz ya da koniye benzeyen alt karın boşluğuna yerleşik kese ile sarılı fibromusküler ve bezsel bir organdır (Şekil 2.1.1). Erişkinde ortalama hacmi 20 mL olan bu bezin yüksekliği 3 cm, genişliği 4 cm ve kalınlığı da 2.5 cm'dir. Prostat bezi üstten idrar kesesine (mesane), alttan ise dış üriner sfinkter ve idrar borusuna (üretra) bağlıdır. (Villers, 1993).

Erkeklerde en büyük yardımcı üreme bezi olan prostat bezi, mesanenin boynunu ve üretranın ilk parçasını sarar ve fibrinolizin, sitrik asit ve asit fosfataz üretir. Prostat içinde 30-50 kadar tubüloalveolar yapıda bez bulunur. Bu bezler boşaltım kanalları yoluyla idrar borusunun prostatik bölümüne açılırlar. Lifsel bağ dokusu yapısında olan prostatik kesede fazla miktarda düz kas lifi bulunur. Prostat lobları prostata kapsülden içeriye giren bölmeler tarafından oluşturulur. Bezlerin etraflarını çeviren stromal doku, düz kas lifi içeren fibroelastik dokudan oluşur ve çevrede kapsül ile ilerler. Bu kasların kasılmaları ile boşalma (ejakülasyon) esnasında prostat salgısının atılımını sağlar (Şeftalioğlu, 1998).

Tubuloalveolar bezlerin boşluklarında sıklıkla, prostat taşı (korpora amilasea) olarak adlandırılan ve prostat salgısının yoğunlaşip kireçlenmesi sonucu oluşan amorf kalsifiye lameller bulunur (Şeftalioğlu, 1998). Prostat, salgı bezi ve temel doku içerir. Genç erkeklerde temel dokunun salgı bezlerine oranı 2:1'dir (Kirby, 2013). Prostat sıvısı bazik pH'ye sahip

laktesans bir sıvıdır ve bu bazik özellik yumurtanın döllenişini için gereklidir. Prostat sıvısı su, sitrik asit, asit fosfataz, amilaz, kolesterol, çinko, tamponlayıcı tuzlar, fosfolipidler, prostaglandinler, prostat duyarlı (spesifik) antijen (PSA), seminal plazmin, kalsiyum sitrat, fosfat iyonları, pıhtılaşma sağlayıcı enzim ve plazminojen gibi maddeleri içerir. Diğer bir deyişle hem pıhtılaşmayı uyaran hem de pıhtılaşmayı durduran enzimler içermektedir. Bu sıvı ejakülatın %30'u kadardır (Balbay, 2008).

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, prostat bezinde anormal hücre çoğalması sonucu prostat bezinin aşırı büyümesi şeklinde ifade edilmektedir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Afrika'nın bazı bölgelerinde erkeklerde yaygın görülen kanser çeşidi olup, kanser nedeniyle ölümlerde ikinci sıradadır. Dünyadaki en yaygın altıncı kanser olup erkeklerde deri kanserinden sonra en yaygın kanser türüdür (Gronberg, 2003; Nahleh, 2006). Amerikan Kanser Birliği verilerine göre 2013 yılında dünya genelinde 238.590 prostat kanseri vakası belirlenmiştir (Siegel, 2013). Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre prostat kanseri görülme sıklığı diğer organ kanserleri arasında 6-7. sıralarda yer almaktadır (Kaygusuz, 2007).

Epidemiyolojik incelemelere göre prostat kanseri 3 etiyolojik faktör (beslenme ve çevre, kalıtsal etkiler, hormonal etkiler) nedeniyle gelişmektedir. Prostat kanserinde hücrelerin büyük bir kısmı hormonlara karşı duyarlıdır ve androjenlerin bulunduğu ortamda hızla çoğalırlar. Nitekim, bir araştırmanın verilerine göre testosteron hormonunun prostat bezi hücrelerinde kanserleşme için yapısal değişimi uyardığı gösterilmiştir (Schwarz, 2004).

Beslenme ve çevresel faktörlerin prostat kanserindeki etkilerini belirlemek için, farklı yerlerde yaşayan aynı ırktan insanlarda bu hastalığın görülme sıklığı saptanmıştır. Japonya'da prostat kanseri insidansı Kuzey Amerika'nın 1/10'u kadar iken, Kuzey Amerika'da yaşayan ikinci ve üçüncü kuşak Japon kökenlilerde bu hastalığın görülme sıklığı Kuzey Amerikalılardaki gibi yüksektir (Brawley, 1998).

2.3. Hormonal Etkiler

2.3.1. Androjenler

Androjenlerin prostat kanserindeki rolü tam olarak açıklanmamış ise de, deneysel çalışmalarda androjenlerin prostat kanseri oluşumunu ve gelişimini etkilediği belirtilmiştir. Androjenler; testosteron, androstenedion, dihidrotestosteron (DHT), dehidroepiandrosteron (DHEA) dan oluşmaktadır (Jonsson, 2009).

Testosteron, erbezlerinde üretilip pasif difüzyonla hedef olan hücreye girer. Hedef dokuda testosteron, steroid 5α -redüktaz enzimiyle DHT'a çevrilir. Androjen reseptörleri, hücrede transkripsiyon faktörü olarak görev alır. Ortamda bulunan testosteron ve DHT, steroid-tiroid-retinoid ailesinin üyesi olan reseptöre bağlanmak için yarışır; bu hormonların reseptöre olan ilgisi aynı olmakla birlikte fizyolojik etkileri aynı değildir. Hormon-reseptör kompleksi gen düzenleme bölgesine bağlanarak transkripsiyonun düzenlenmesini sağlar (Miyamoto, 1993). Amerikadaki Afrika kökenlilerde prostat kanserinin oldukça fazla görülmesinin nedeni serumda androjen düzeyinin fazla olmasıdır (Ross, 1986). Androjenlerin prostat kanserine etkisini saptamak için birçok araştırma yapılmıştır. Deneysel bir çalışmada, 5α -redüktaz enzimi ya da testosteronun prostat kanserinin gelişimi ile bir ilgisi olmadığını gösterirken (Guess, 1990), başka bir çalışmada ise testosteronun artışı ile prostat kanseri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur (Gann, 1996). Ancak androjen ve metabolitlerinin prostat kanseri ile ilişkisi ise tam olarak açıklanamamaktadır. Nitekim serumdaki bütün androjen seviyesini, dolaşımdaki testosteron düzeyindeki önemli diurnal değişiklikler etkilemektedir (Prehn, 1999).

Androjen miktarının baskılanmasıyla ya da reseptörlerinin farklı gen tedavileri ile aktivasyonunun önlenmesi ile androjen miktarları azaltılır. Prostat kanserinde, ileri evre tedavilerinde androjen düzeylerinin azaltılmasının etkili bir tedavi şekli olabileceği belirtilmiştir. Fakat, bu tedavi şekli uzun süreli olamaz, çünkü hücreler, androjen baskılanmasına yanıtız hale gelmektedir. Bu nedenle hormona dirençli prostat kanseri olarak ifade edilmektedir (Tunçkiran ve Bozlu, 2007).

2.3.2. Prostata özel antijen

Prostata özel antijen (prostate specific antigen=PSA), prostat bezinde oluşan glikoprotein olup semenin sıvılaşmasında etkilidir. PSA'nın erişkinlerdeki miktarı 0-4 ng/mL düzeyindedir. Seminal sıvıda yüksek oranda bulunan PSA, serumda düşüktür. Serum PSA'sının %65-90'ı α -1-antikimotripsin ve α -2 makroglobuline bağlı haldeyken, diğer kısmı serbest haldedir. Serbest PSA ile α -1-antikimotripsine bağlı PSA immünolojik olarak belirlenebilmektedir. Serumda yapılan PSA analizleri prostat kanser tanısını belirlemek için kullanılmaktadır. Prostat kanserinde hücrelerin farklılaşma derecesine göre PSA üretimi değişken olup ileri aşamada farklılaşmış prostat kanseri dokularının PSA üretimi, erken evredekilere göre daha fazladır (Lin, 2013).

2.4. Genetik Faktörler

Bütün kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de genetik yatkınlık görülme sıklığını etkileyen temel etmenddir. Zira babaları ve erkek kardeşleri prostat kanserli erkeklerde prostat kanseri oluşma riski oldukça yüksektir. Ayrıca aynı ailede kolon ya da meme kanseri olan kişilerin

prostat kanserine yakalanma riskinin de yüksek olduğu saptanmıştır (Lessick and Katz, 2006). Bütün prostat kanseri olgularının %9'unda ve 55 yaşın altındaki vakaların %43'ünde otozomal dominant geçişli yatkınlık genleri saptanmıştır. Prostat kanserine neden olan gen bölgeleri; 17. kromozomun kısa kolunda bulunan ELAC2 geni, 1. kromozomun uzun kolunda lokalize alan HPC1 geni, 5-alfa-redüktaz tip II geni, androjen reseptörü geni, PSA geni gibi ailesel ve ara sıra görülen mutasyonların gen bölgeleri tespit edilmiştir (Lessick and Katz, 2006).

2.5. Prostat Kanseri Tedavi Modelleri

Her ne kadar cerrahi girişim öncelikli olarak yapılsa da ilerlemiş prostat kanseri olgularında androjenlerin baskılanması etkili bir tedavi şeklidir. Ancak androjen bağımsız hücre dizileri ya da hormona duysuz prostat kanseri gelişmesi nedeniyle androjen baskılanması yöntemi 1-4 yıllar arasında cevapsız kalmaktadır. Bu durumda ikincil hormon uygulamaları, kemoterapi, radyoterapi uygulamaları ve yeni geliştirilen ajanlarla amaca yönelik tedaviler yapılmaktadır. Hormona dirençli prostat kanseri vakalarında androjen baskılama yöntemine devam edilmelidir, zira bazı araştırmalarda testosteron uygulandığında hastalığın olumsuz etkilendiği görülmüştür (Lee, 2013).

2.5.1. İkincil hormonal tedaviler

Testosteron ile androjen reseptörüne bağlanmak için yarışa giren flutamid ajanı, hormona dirençli prostat kanseri oluşumundan sonra verildiğinde olumlu cevaplar alınmaktadır. Megestrol, dietilstilbestrol, tamoksifen, hidrokortizon, aminoglutetimid, deksametazon ve prednizon ikincil hormonal tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ajanların tek başına kullanılmalarının yanı sıra kombine uygulanmalarının yaşam süresini arttırmada daha etkili oldukları belirtilmiştir. Adrenal steroidlerin üretimini baskılayan ketokonazol, hidrokortizonla birlikte uygulanmalıdır. Ketokonazol tedavisinin etkinliğini araştıran çalışmalarda PSA'nın %50'nin üzerinde azaldığı saptanmıştır (Lee, 2013).

2.5.2. Kemoterapi uygulamaları

Prostat kanseri kemoterapiye direnç göstermektedir. Geçmişte, kemoterapi sonrası hastalığa cevap %8.7 seviyesinde kalmıştır. Günümüzde ifosfamid, oral etoposid, melfelan, gemsitabin, idarubisin, topotekan ve irinotecan gibi tek başlarına uygulanan kemoterapotiklerle hastalığa cevap oranı %10'u geçememiştir. DNA ile etkileşerek DNA'nın biyosentezini önlediği sanılan doksorubisin ile siklofosfamid kombinasyonunun başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Fornari, 1994). Etoposid, pirarubisin ve cisplatin birlikteliği ise PSA cevabını %70'lere yükseltmektedir. Mikrotübül proteinlerine bağlanarak bölünmeyi engelleyen estramustinin taksanlar ile birlikteliğinin hormona dirençli

prostat kanseri vakalarına etkileri incelenmiştir (Small, 1996). Ayrıca estramustin ve paklitakselin birlikteliğini inceleyen faz I çalışmalarının verilerine göre PSA %65 civarında düşerken prostat hastalığı da %42 oranında azalmıştır (Hudes, 1995).

Hormona dirençli prostat kanseri olgularında, kemoterapiden sonra bazı hastalar fayda görmüş olmakla birlikte, yaşam süresinde önemli derecede artış sağlayan tedavi şekli gösterilememiştir. Son zamanlarda dositaksel, estramustin ve mitoksantron başta olmak üzere taksanlar içeren tedavi protokolleri önemli faydası olan terapilerdir. Ayrıca bu vakalarda cerrahi ve radyoterapinin birlikte uygulanması da tavsiye edilmektedir (Fornari,1994).

2.6. Prostat Kanserinin Klinik Özellikleri

Prostat kanserinde rektal muayene hem pratik hem de güvenilir bir yöntemdir. Ancak patolojik tanımlama önemlidir (Epstein, 1995; Tanagho and McAninch, 1995; Walsh, 2002; Eble, 2004). Çünkü erken prostat kanserlerinin fokal nodüler hiperplazi, granülomatöz prostat iltihabı, tüberküloz, infarkt veya lithiazis ile ayırıcı tanısının yapılması gerekir (Rosai and Ackerman, 2004). Transrektal ultrasonografi 5mm'den küçük kanserlerin gösterilmesinde yararlıdır, ancak %30 vakada atlanabilir. Bunlar izoekoik olarak görülen grup olup, şu anda bunları ortaya koyacak herhangi bir alet yoktur (Walsh, 2002).

PSA, Wang tarafından 1979'da tanımlanan glikoprotein olup prostat asinüs epitelinden salgılanır. PSA'nın kan düzeyleri günlük değişir. PSA 0-4 ng/mL ise normal, 4-10 ng/mL şüpheli, 10-20 ng/mL biyopsi endikasyonu, 20 ng/mL üzerinde ise de tümör kabul edilmektedir. PSA, hastanın yaşıyla ve benign prostat hiperplazisinin volümü ile paralellik göstermektedir. Yaş ilerledikçe kan serumundaki miktarı artar (Korkud ve Karabay, 1993; Eble, 2004; İnci, 1995).

PSA, kanal epiteli kaynaklı tümörlerde %100 artar. İleri farklılaşmış karsinomlar, az ve farklılaşmamış karsinomlardan daha çok PSA yapar (Tanagho and McAninch, 1995; Walsh, 2002; İnci, 1995). Yüksek duyarlılığa ve özelliğe sahip olduğu için, hızlı ve ucuz bir testtir (Michael, 2002; Tanagho and McAninch, 1995). PSA'nın hafif yüksekliği nodüler büyümede de izlenmektedir, ancak seri takiplerde artış devam etmekte ise biyopsi ile doğrulanmalıdır (Sternberg, 1999; Rosai and Ackerman, 2004). Prostat kanserli hastaların hemen yarısında PSA değerleri 10 ng/mL'nin üzerindedir. PSA yüksekliği prostatitlerde, prostatik infarktlarda, prostatın majör travmasında izlenebilir ancak bu yükseklik geçicidir ve tedavi sonrası normal değerlere iner. Rektal muayene, transrektal ultrasonografi ve serum PSA ölçümü üçlüsü erken prostatik karsinom açısından kuvvetli tanısal değer taşımaktadır (Tanagho and McAninch, 1995; İnci, 1995).

2.7. Prostat Kanserinin Patolojik Özellikleri

Prostat kanserlerinin %95 kadarı adenokarsinoma, geriye kalanların ise %90'ından fazlası değişik epitel hücreli kanserlerdir. Adenokarsinomların %60-70'i çevresel bölgede, %10-20'si değişik bölgede, %5-10'u merkez bölgede bulunur (Presti, 2000). Prostat adenokarsinomlarının %85'ten fazlası çok odaklıdır (Walsh, 2002). Prostat adenokarsinomu derecelendirilmesinde en geçerli yöntem Gleason sistemidir (Epstein, 2005; Gleason, 1992). Prostat tümörlerini Mostofi ve ark. (1980) hücre tipini ve maligniteyi baz alarak gruplandırmışlardır (Mostofi, 1980).

I. Epitel tümörleri

A. Benign:

1. Papiller adenom

B. Malign:

1. Asiner adenokarsinom (prostat adenokarsinom)
2. Transizyonel hücreli karsinom
3. Skuamöz hücreli karsinom
4. Periüretral duktal karsinom
5. Papiller duktal karsinom
6. Endometrial karsinom
7. İndiferansiye karsinom
8. Müsinöz adenokarsinom
9. Papiller kistadenokarsinom
10. Adenomatoid kistik adenokarsinom

II. Epitelyal olmayan tümörler

A. Benign:

1. Leiomyom
2. Fibrom

B. Malign:

1. Rabdomyosarkom
2. Leiomyosarkom
3. Fibrosarkom
4. Malign fibröz histiyositom

III. Karışık tümörler

1. Karsinoid
2. Karsinosarkom
3. Malign melanom
4. Nevüs

IV. Metastatik tümörler

2.8. Kanser ve Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri

Kanser, yapısal olarak değişmiş hücrelerin devamlı bölünmesiyle oluşan bir hastalıktır. Kanserde aşırı miktarda artan hücreler, normal olarak gerçekleşen yeterli sayıda hücre ölümü ile dengelenememektedir.

Değişime uğrayarak kanserleşen bu hücreler buldukları dokuya ve bedenın diğer bölgelerine yayılırlar ve hastanın organlarına zarar verirler. Bu hücreler köken aldıkları sağlıklı hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücrelerin oluşması ve bu nedenle birikmesi çok daha hızlıdır. Aşırı hücre çoğalması nedeniyle meydana gelen bu dengesiz durum hem genetik anomalili kanser hücrelerinden hem de bağışıklık sisteminin bu hücreleri tanıma ve yok etme yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Kanser hücrelerinde olup, sağlıklı hücrelerde bulunmayan bazı özellikler şunlardır (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard and Earnshaw, 2004):

- Kanserleşen hücre üreme kontrolünü kaybetmiştir. Normal hücrelerde gereksiz çoğalmayı önleyen baskılama mekanizması kanser hücrelerinde bozulmuş olur.

- Kanserleşen hücre, dokuya özgü olan yapısal özelliğini ve morfolojik yapısını kaybetmiştir. Kanserleşen hücreler normal hücrelere göre küçük, ancak çekirdekleri daha büyük olur.

- Kanserleşen dokuda, bölünen hücrelerde normal farklılaşma gerçekleşmez.

- Kanserleşen hücrelerin arasında dokuya özgü kontakt inhibisyon oluşmaz.

- Kanserleşen hücrenin metabolizması değişmiştir. Genellikle şeker alınımları artmış ve anaerobik solunum oranı yükselmiştir.

- Kanserleşen hücrede dokudaki faaliyetlerine özgü proteinlerinin bir kısmı sentezlenemez ve dolayısıyla bu hücreler normal fonksiyonlarını sürdüremezler.

- Kanserleşen hücrelerin enzimlerinde miktar ve fonksiyon bakımından değişiklikler oluşur.

- Kanserleşen hücrenin antijenik özellikleri değişmiştir.

- Kanserleşen hücrelerin hacimleri normal hücrelere oranla daha küçük olup mikroskop altında kolaylıkla ayırt edilebilirler.

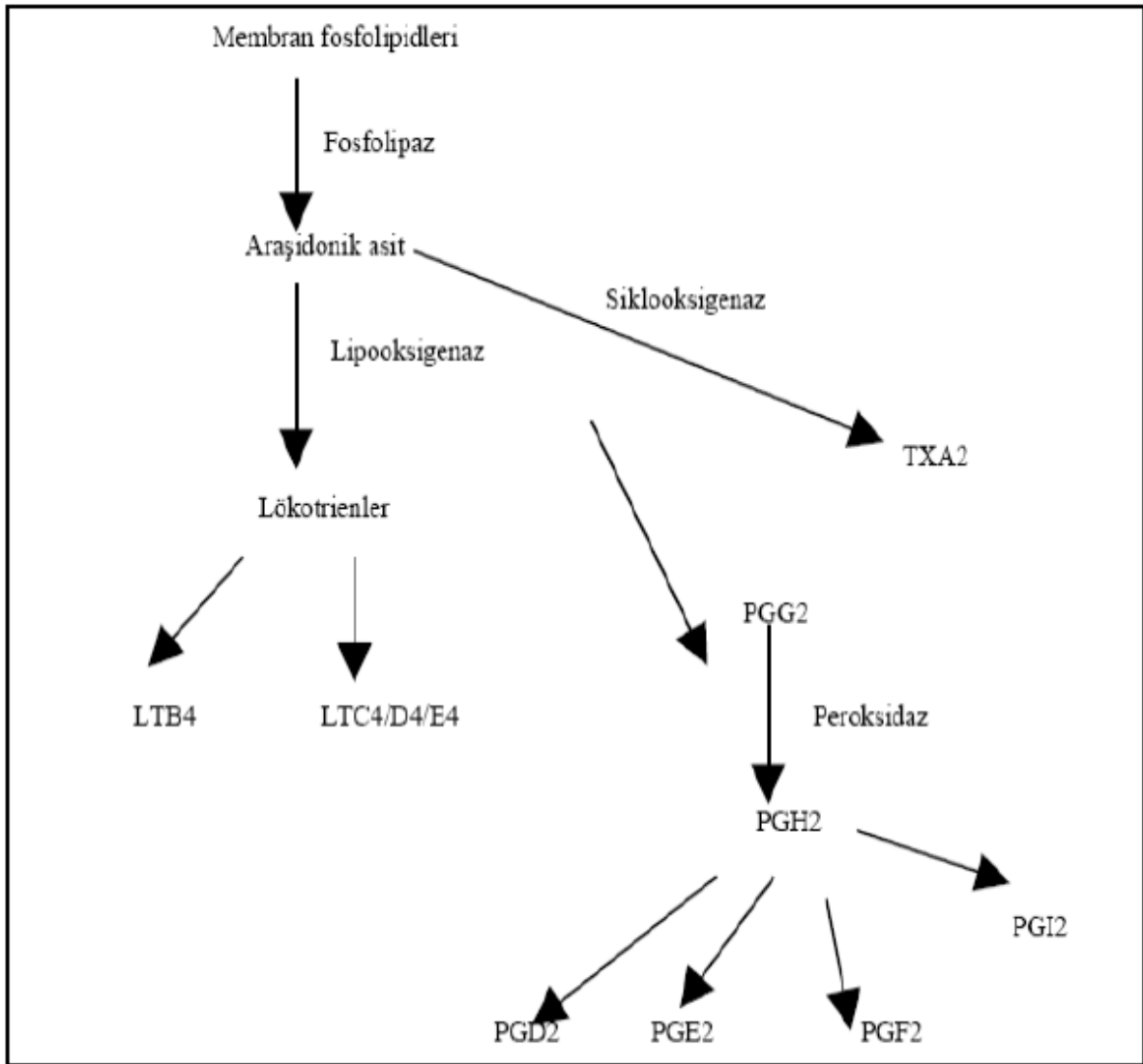
- Kanserleşen hücrelerde apoptoz mekanizması engellenmiştir.

- Kanserleşen hücrede telomeraz aktivitesi devam ettiğinden hücre ölmeksizin bölünmesini sürdürür.

2.9. Siklooksijenazlar

Siklooksijenaz (COX) enzim sistemi COX-1 ve COX-2 enzimleri aracılığı ile araşidonik asitten prostaglandinler (PG) ve tromboksan sentezini sağlarlar. COX-1 ve COX-2 enzimleri endoplazmik retikulumda bulunur ve sırasıyla 72 ve 74 kDa ağırlığındadırlar. Bu iki enzim de COX ve peroksidaz aktivitesine sahiptir. Bu enzimler sırasıyla aktive olarak, önce araşidonik asitten PGG₂ ve PGH₂ sentezlenir, ardından birçok prostaglandin (PGD₂, PGE₂, PGI₂) ve tromboksan A₂ (TxA₂) sentezlenir. COX-1 tüm dokularda bulunur ve normal hücresel işlevlerin yürütülmesi için gerekli olup, mide-barsak ve böbrek işlevlerinde önemli rol oynamaktadır. COX-2, her dokuda bulunmaz, daha çok beyin, testis ve trakeada bulunmaktadır. Hücre dışı uyaranlar, büyüme faktörleri,

sitokinler, hormonlar, peroksizomal proliferatörler, hipoksi, iyonize radyasyon ve bazı karsinojenler COX-2 sentezini arttırmaktadır. COX-2'nin uyarılması, gen ifadesinin artışı ve COX-2 mRNA'sının stabilizasyonuna neden olmaktadır. Hücre içindeki birçok sinyal iletimi ve metabolik yolakta önemli yerleri olan COX enzimleri, pekçok fizyolojik ve patolojik oluşumda yer alırlar. Özellikle hemostaz, trombosit agregasyonu, böbrek ve mide işlevlerinde, bağışıklık sisteminde, kemik metabolizmasında, üreme ve hormonal sistemde, inflamasyon ve kanserde ve hücre içinde enerji transfer sistemi oksidasyon reaksiyonlarında da aktif rol almaktadırlar (Masahiko etal., 1998, Tmothy, 1998, Shan, 2004).



Şekil 2.9.1. Araşidonik asitten prostaglandinler ve tromboksan sentezi

COX-2'nin aşırı artışı karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Nitekim kolorektal kanser, meme, prostat, mesane, mide, özefagus, cilt, karaciğer, pankreas, beyin ve akciğer gibi birçok kanser türünde COX-2 artışı gösterilmiştir. Bu nedenle COX-2 inhibitörlerinin kanserin önlenmesinde ya da tedavisinde fırsat yaratabileceği düşünülmektedir.

Birçok deneysel ve klinik çalışmada, COX-2 enziminin, hücre proliferasyonu, artmış anjiyogenez, defektif apoptoz, metastaz artışı, immünsupresyon, mutajenik etki, oksidatif ürünlerde artış ve aromataz enzim indüksiyonu yaptığı gösterilmiştir. COX-2 ilişkili apoptoz inhibisyonu birçok tümör dokusunda gösterilmiştir. COX-2, hücre döngüsünde G1 fazında yavaşlamaya neden olarak apoptozda dirence sebep olur. NSAİİ tümör dokusunda apoptoz artışı ve tümör gerilemesine yol açmaktadır. Son zamanlarda birçok epidemiyolojik vaka çalışmaları aspirin ve diğer NSAİİ'lerin alınması küçük hücreli olmayan akciğer kanseri riskini azaltabildiğini göstermiştir (Gupta, 2000, Castelo, 2003, Sanchez-Alcazar, 2003, Shan, 2004, Karen, 2004,).

2.10. Kanserli Hücrelerin Apoptoza Gidememesi

Apoptoz mutasyon sonucu gelişen, anormal DNA'ya sahip hücreleri ortadan kaldırır. DNA anormalliği ya onarılması imkansız DNA hasarı oluşmuş ya da hatalı, eksik veya gerekli olmayan fazla transkribe olmuş DNA'dan meydana gelmektedir. Apoptoz, bir türün kromozom sayısının doğru şekilde sürdürülmesinde temel işlevdir (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard and Earnshaw, 2004).

Apoptoz programlı olarak normal doku kaybından sorumludur. Bunun klasik örneğini larva döneminde kuyruğa sahip kurbağaların erişkin haline geçtiklerinde kuyruklarının kaybolmasından, primatlarda embriyonel gelişim esnasında görülen parmaklar arası perdelerin eritilmesi oluşturmaktadır. Diğer taraftan yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılmaları da apoptoz mekanizmaları ile sağlanır. Yine apoptoz, canlının kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin ortadan kaldırılmasını sağlayarak bu hücrelerin organizmaya karşı immün atağını önler (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard and Earnshaw, 2004).

Apoptoz sırasında hücrelerde organeller toplanırlar ve ardından çekirdeğin yoğunlaşip parçalanmasıyla birlikte hücre apoptotik cisimciklere ayrılır. Makrofajlar ya da komşu hücreler bu cisimcikleri fagosite ederler. Nekrozun aksine, apoptozda inflamasyon oluşmaz. Apoptozda evrimsel süreçte korunan bazı özel proteinlerin üretimi sağlanır (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard and Earnshaw, 2004).

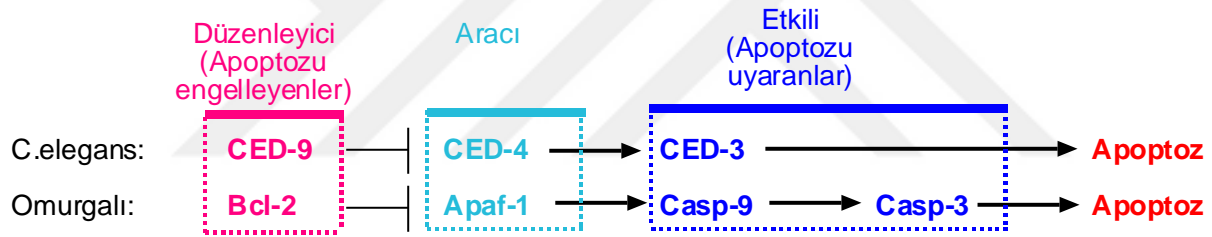
Kanser ile bazı bağışıklık sistemi hücreleri normal dokularda apoptozu anormal olarak uyaran kimyasalları sentezlerler. Apoptoz kalıtsal olarak düzenlenir ve malign hücrelerde bozulabilir. p53 tümör baskılayıcı gen apoptozu uyarırken onkogen olan Bcl-2 apoptozu durdurur. Böylelikle normal hücre ölümü yavaşlatılır ve aşırı hücre birikimine neden olur. Kanserli hücrelerin kemoterapi, hormonlar ile radyasyon tedavisiyle azaltılması veya ortadan kaldırılmasında temel mekanizma apoptoz olabilir (Lowitz ve Casciato, 2007; Polard and Earnshaw, 2004).

2.11. Apoptoz Mekanizmaları

Programlı hücre ölümü olan apoptoz kalıtsal olarak kontrol edilir. Apoptozda birkaç mekanizma açıklanmıştır.

2.11.1. Kaspazlar aracılığıyla hücre ölümü

Caenorhabditis elegans'ta yapılan araştırmalardan ortaya çıkarılan veriler ile apoptozun düzenlenmesinde rol alan mutasyonlar saptanmıştır. Bu araştırmalar esnasında; ced-3 veya ced-4 genlerinde işlev kaybı mutasyonu bulunan hücrelerde, apoptoz oluşmadığı gözlenmiştir. Proteaz aktive edici faktör olan ced-4 proteini, ced-3 proteinini aktive eder. Aktive olan ced-3 de apoptozu uyarır. Bu kurtçukta apoptozu önleyen ced-9 proteinini üreten ced-9 geni mutasyona uğrarsa kurtçuğun bütün hücreleri embriyonal gelişim sırasında ölür. Bu durum gösteriyor ki, ced-3 ve ced-4 genleri apoptozun gerçekleşmesi için gereklidir. ced-9 ise ölmemesi gereken hücreleri korumaktadır, yani apoptozu önlemektedir. Ancak, ced-3 ve ced-9 mutasyonlarını aynı anda taşıyan kurtçukların da yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Buradan ced-9 geninin, ced-3 geninden önce etkinlik gösterdiği anlamı çıkmaktadır (Güneş, 2014).



Şekil 2.11.1.1 Apoptozda rolü olan proteinler (Güneş, 2014).

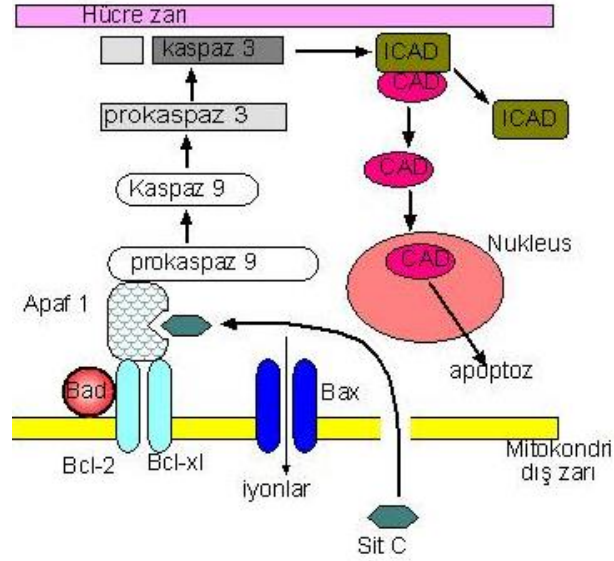
İnsanlarda, foliküler lenfomadan elde edilen apoptotik Bcl-2 geninin bir mutasyonunu bulunduran bireylerde, kromozomlar tekrar düzenlendiğinden lenfoma oluşmaktadır. C.elegans'ın ced-9 geni ile insan Bcl-2 geni homologtur. Bu iki genin ürettikleri Bcl-2 ve ced-9 proteinleri normal koşullarda apoptozu engellerler. Bcl-2 ve ced-9 proteinleri zar katedici proteinlerdir. Bu proteinlerin mitokondri dış zarı, çekirdek ve endoplazmik retikulum zarlarında bulunduğu saptanmıştır. Normalde Bcl-2 proteini apoptozu inhibe etmektedir ancak hücrede Bcl-2 ile ilişkili Bax gibi bazı proteinler apoptozu uyarmaktadır. Bu nedenle hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alan proteinler; antiapoptotik düzenleyiciler (Bcl-2, ced-9) ve proapoptotik düzenleyiciler (Bax, Bad) olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Güneş, 2014, Keane, 2001).

Memelilerde Bcl-2 üyesi 6 proteinin programlı hücre ölümünü baskıladığı, 9 proteinin ise programlı hücre ölümünü uyardığı bildirilmiştir. Omurgalı hayvanlarda programlı hücre ölümünde etkili olan proteinler kaspazlar olarak adlandırılır. Kaspazlar katalitik bölgelerinde bir sistein

kalıntısı içerdikleri, hedef proteinleri C terminalindeki aspartik asitten kestikleri ve dolayısıyla enzim işlevi gördükleri için kaspaz (caspase) olarak isimlendirilmişlerdir. İnsanda birbirinden farklı 15 kaspaz proteini saptanmıştır. Kaspazlar, prokaspaz şeklinde inaktif olarak üretildikten sonra bazı kısımları kesilerek aktive edilirler. Apoptoz yolağında, bir protein tarafından uyarılan kaspaz-9, kaspaz-3' ün belirli bölgelerini keserek aktive eder. Aktiflenen kaspaz-3, sitozolde bulunan kaspaz aktive edici deoksiribonukleaz inhibitörü (ICAD)' nün aktivitesini ortadan kaldırır. Aktivitesi kaybolan ICAD, normal durumdayken bağlı olduğu kaspaz aktive edici deoksiribonukleaz (CAD) dan ayrılır. Serbestleşen CAD, çekirdeğe geçerek kromatin kondensasyonu ve kromozom kırıklarının oluşması yoluyla hücrenin programlı olarak ölmesine neden olur (Güneş, 2014, Keane, 2001).

Bazı Bcl-2 üyeleri, mitokondrilerin istikrarını korurken bazıları bozar. Böylelikle sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya geçişini denetler. Normal hücrelerde mitokondrinin zarları arasında bulunan sitokrom C' nin buradan sitoplazmaya geçmesi apoptozu başlatır. Bcl-2, sitokrom C' nin sitoplazmaya taşınmasını önlerken, Bax sitozole geçişine yardım eder (Güneş, 2014, Keane, 2001).

Programlı hücre ölümü yolağında; hücrenin yaşamsal işlevlerini yapmasını sağlayan etmenlerin var olmaması, sitozolde reaktif oksijen türlerinin birikmesi ve stres gibi farklı etkiler sonucu, bir proapoptotik protein olan Bad, mitokondri dış zarında bulunan ve antiapoptotik düzenleyiciler olan Bcl-2/Bcl-xl' ye bağlanarak Bcl-2/Bcl-xl kompleksinin Bax ile bağlantı kurmasını engeller. Bu durumda Bax homodimeri veya Bcl-2/Bax heterodimeri tarafından mitokondri dış zarında bir kanal oluşturularak, çeşitli iyonların kontrolsüz bir şekilde mitokondriye girişine olanak sağlar. Sonuçta mitokondri bütünlüğü bozulduğundan sitokrom C sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada; sitokrom C, aracı bir protein olan apoptozda proteaz aktive edici faktör (Apaf-1)'e bağlanarak kaspaz yolağını aktive ederek apoptozun oluşması sağlanır (Güneş, 2014, Rao, 2001, Wingrave, 2003).



Şekil 2.11.1.2. Apoptoz mekanizmasında hücre içinde oluşan bir etki sonucu hücre ölümü (Güneş, 2014).

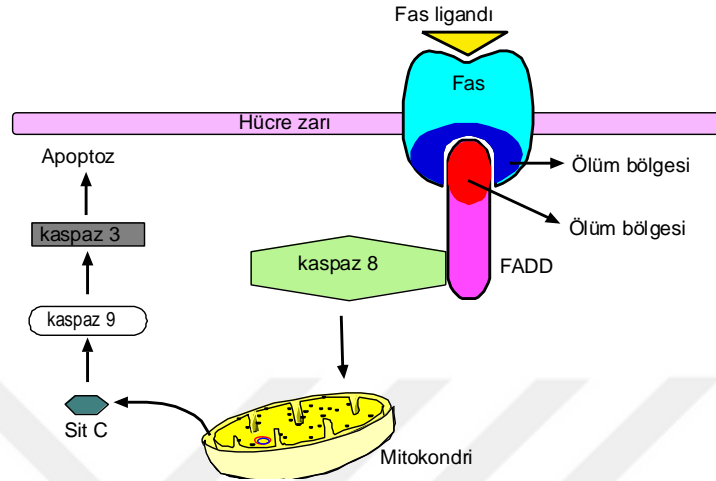
Ortamda bulunan sinir büyüme faktörünün hücre zarındaki reseptör ile birleşmesi, fosfatidil inositol-3 kinaz (IP-3 kinaz) yolağını uyararak Akt kinazın aktifleşmesini sağlar. Aktif Akt kinaz, Bad' ı fosforlayarak aktive eder. Bu durumda Bad, Bcl-2/Bcl-xl ile birleşmez, sitozolde bulunan protein 14-3-3 ile kompleks kurar. Diğer taraftan Bad ile birleşmeyen Bcl-2/Bcl-xl, Bax ile birleşerek Bax' ın mitokondriyal zarı kanal oluşturmasını engeller. Böylece sitokrom C sitoplazmaya taşınamaz. Bu durumda kaspaz yolağı aktifleşemeyeceğinden hücre yaşamını sürdürür (Rao, 2001, Wingrave, 2003)

2.11.2. Ölüm sinyalleri aracılığıyla hücre ölümü

Hücre ölümü, her ne kadar yaşamsal uyarıların yokluğunda ortaya çıkıyorsa da, apoptoz ölüm sinyalleri varlığında da ortaya çıkabilir. Hücre ölümü ve bazı kronik inflamatuvar hastalıklarda doku yıkımını başlatan tümör nekroz faktör (TNF) makrofajlardan salgınır. Sitotoksik T lenfositlerinde sentezlenen bir hücre yüzey proteini olan Fas ligandı hücre ölümü oluşturan diğer bir sinyal molekülüdür. Fas, virüs tarafından enfekte edilen hücrelerin, bazı kanser hücrelerinin ve yabancı doku hücrelerinin ölümünü sağlar (Lou, 1998, Keane, 2001).

Hem TNF hem de Fas ligandı, hedef hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanarak reseptörleri aktifleştirirler. Aktifleşen Fas reseptörü Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) denen, aktifleşen TNF reseptörü TNF reseptörü ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) denen bir hücre içi proteinini kendisine çeker. TNF ve FAS reseptörleri ölüm reseptörleri olarak isimlendirilirler. Hem TNF ve FAS reseptörleri hem de FADD ve TRADD gibi bazı sitozolik proteinler ölüm sinyalini ileten yaklaşık 80 aminoasitlik ölüm bölgesi adı verilen bir kısım taşırlar. FADD tarafından

aktifleştirilen kaspaz 8, hem kendi proenzim halini aktifleştirir hem de mitokondriden sitokrom C' nin sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitozole geçen Sitokrom C, kaspaz 8 varlığında proenzim halindeki etkili kaspazlara bağlanarak onları aktifleştirir. Aktifleşen kaspazlar hücre ölümünü gerçekleştirir (Kromer, 1995, Banasiak and Haddad, 1998).



Şekil 2.11.2.1. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi (Gunes, 2014).

2.12. Glioma

Merkezi sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubu beyindeki glia hücrelerinden gelişen ve glioma olarak adlandırılan tümörlerden oluşmaktadır. Glioma genellikle erişkin insanlarda oluşan ciddi bir beyin tümörüdür (Berens, 1990; Kemerli, 2005; Englot, 2012). Gliomların histolojik sınıflaması tümör hücrelerinin normal hücrelerle morfolojik benzerlikleri ile belirli yapısal özelliklerine dayanır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında birçok glioma astrositik, oligodendrogial, miks oligoastrositik veya ependimal tümör olarak gruplara ayrılır. Kanser genom haritası araştırma ağının (2008) verilerine göre beyin tümörlerinin %23'ünü oluşturan astrositik tümörler en sık olanları iken glioblastoma en malign olanıdır (Kim, 2012).

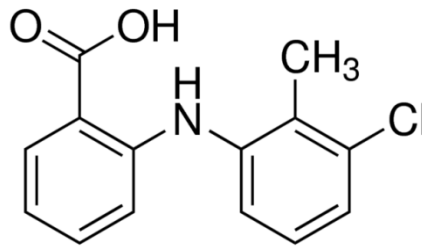
Glioblastoma vakaları daha çok 45-70 yaş arasındaki insanlarda görülsede her yaşta görülebilir. Çocuklukta görülme sıklığı azdır. Glioblastoma vakalarında erkeklerin kadınlara oranı 3/2 dir. Glioblastoma beyin yarımkürelerine lokalize olan ve içeri sızan kanserdir (DeAngelis, 2001; Kleihues and Cavenee, 2000). Glioblastomaların makroskopik incelemelerinde, tümör dokusu normal dokudan belirgin sınırlarla ayrılmasına rağmen mikroskopik incelemelerde tümörden uzak normal dokulara infiltre olduğu görülmektedir (Burger and Kleihues, 1989; Kelly, 1987; Maity, 2004). Yüksek derecede dokuya sızan tümörler olduklarından normal beyin dokusunda ödeme yol açar. Kesit yüzeylerinde sıklıkla kanama, kist oluşumları ve ölmüş doku bölgelerine rastlanır (Maity, 2004).

Glioblastoma sebepli semptom ve belirtilerin çoğu hızlı büyümekte olan tümöre, çevrede oluşturduğu ödeme, tıkanmalara ve artmış kafa içi basıncına bağlıdır. Belli başlı belirtileri baş ağrısı, bulantı, kusma, sara nöbetleri, nöromotor işlev kaybı ve mental değişikliklerdir (Karlsson, 2004; Levin, 2001).

Beyin tümörlerinin tedavisi zordur. Günümüzde glioma tedavisinde tümörün yerleştiği yere, kanserli hücre tipine ve malinlik derecesine bağlı olarak radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi girişim yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak ne yazık ki birçok glioma tedaviden sonra tekrarlayabilir ve bu nedenle glioma tedavisi için acilen kimyasal yeni bileşiklerin bulunması gerekir (Mattox, 2012).

2.13.Tolfenamik Asit

Tolfenamik asit (TA) ticari olarak insan için Clotam ve Tufnil, veteriner kullanımı için Tolfedine adı altında satılmaktadır. TA'nın sistematik (IUPAC) adı 2(3-Chloro-2-methylanilino) benzoic acid'tir (Şekil 2.13.1) ve fenamed'ler sınıfına aittir (Andersen, 1989; Basha, 2011).



Şekil 2.13.1. Tolfenamik asitin kimyasal yapısı.

Küçük molekülü, NSAİİ grubundan olan TA yaygın bir şekilde kullanılan diğer NSAİİ'lerden daha az gastrointestinal yan etkilere sahiptir. Gastrointestinal kanama veya ülserasyon TA'nın sadece yüksek oral dozlarında görülebilir. Az sayıdaki vakada yorgunluk, baş ağrısı, vertigo, titreme, coşku ve kansızlık gibi yan etkiler görülebildiği rapor edilmiştir. Hayvanlarda yapılan bir çalışmada TA'nın ketoprofen, indomethacin ve naproxeni de içeren diğer 10 NSAİİ ile karşılaştırıldığında bu 10 NSAİİ'den çok daha az gastroülserojeniteye neden olduğu belirlenmiştir (Eskerod, 1994).

Birçok hayvan modelinde gösterildiği gibi ağrı kesici ve ateş düşürücü özellikleri olan TA'nın, romatoid artrit ve osteoartritin tedavisinde iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Zachariae and Sylvest, 1972; Rejholec, 1979; Wankya, 1981). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda TA'nın kolorektal kanser hücrelerinde olduğu gibi pankreatik kanser modellerinde metastaz ve tümör gelişiminde apoptozu uyararak antikanser aktivite gösterdiği öne sürülmüştür (Abdelrahim, 2006; Abdelrahim, 2007; Lee,

2008). Ayrıca tolfenamik asitin akciğer, özefagus, göğüs ve ovaryum kanserlerinde hücre büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (Basha, 2011a; Basha, 2011b; Papineni, 2009). Choi ve ark., (2011) yaptıkları bir çalışmada TA'nın PC-3 ve DU-145 insan androjen bağımsız prostat kanser hücrelerinde büyümeyi baskıladığı ve apoptozu uyardığı, çekirdek parçalanması, kaspaz 3 bölünmesi ve poli (ADP-riboz) polimeraz ölçümleri ile kanıtlanmıştır (Choi, 2011).

Tolfenamik asitin antikanser aktivitesinin COX'dan bağımsız olduğu ve özgünlük protein (Sp) transkripsiyon faktörlerinin bozulması ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Sp proteinleri birçok insan kanserlerinin büyüme ve metastazında kritik roller oynar (Bouwman and Philipsen, 2002; Safe and Kim, 2004). TA, Sp1 proteinini hem PC-3 hemde DU145 hücrelerinde baskılar (Choi, 2011). Sp proteinin prostat kanserinde ilginç rolü vardır. Sp1/Sp3-bağlanma bölgeleri, prostat spesifik antijen geninin proksimal promotor bölgesinde bulunmuştur ve prostat spesifik antijeninin aktivitesine yardımcı olur (Shin, 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre kültürünün yapılması

Fizyolojik ve patolojik süreçlerin incelenmesi, hücre içi haberci sisteminin işleyişinin anlaşılması, gen fonksiyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ile hücre ölümü mekanizmalarının belirlenebilmesi için çoğunlukla hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Çoğu hücre kültürleri %95 O₂ ve %5 CO₂ ile temel olarak hiperoksit nemli bir ortamdır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağladığı sürece gelişir ve çoğalırlar. Çalışmamızda insan glioma hücre dizisi (T98G) ve insan prostat kanser hücre dizisi (LNCaP) kullanılmıştır.

3.2. Kültür için yapılan hazırlıklar

Sıvı halinde ve steril şişelerde bulunan Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) buzdolabında 4 °C'de saklandı. Fetal dana serumu (Fetal calf serum = FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) küçük hacimlere bölünerek buzdolabında eksi 20 °C'de saklandı. Toz halindeki tolfenamik asit (Cayman) dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözülerek, elde edilen çözeltiden her deneyden önce istenen dozlar taze olarak hazırlandı.

3.3. Hücrelerin ekimi ve yaşatılması

Önceden sıvı nitrojen içerisinde dondurularak saklanmış olan T98G ve LNCaP hücreleri, nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra DMEM, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C'de 5 dakika döndürüldü. Üstteki sıvı atılarak dondurma işleminde kullanılan DMSO uzaklaştırılmış oldu. Dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flasklara (25 cm²) ekilerek 37 °C, %5 CO₂ ve %100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, kuluçka süresince ters ışık mikroskobu (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları gözlemlendi. Eskiyen besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1 mL penisilin + streptomisin, 1 mL FCS ve 8.9 mL DMEM bulunan besiyeriyle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra 75 cm²'lik flasklara alındı. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya deneye alındı.

3.4. Deney grupları

Çalışmamızda TA'nın insan glioma hücreleri (T-98G) ve androjen duyarlı insan prostat kanser hücre dizileri (LNCaP) üzerine etkisini değerlendirmek için tolfenamik asitin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM'lık dozları 24 ve 48 saatte MTT, ardından etkili bulunan dozlarda akım sitometri ve qRT-PCR teknikleri kullanıldı. Oluşturulan deney grupları şöyledir:

1. ve 2. gruplar: 24 ve 48 saat için kontrol grubu oluşturuldu ve bunlara sadece besiyeri uygulandı.

3. ve 4. gruplar: Çözücü DMSO, 24 ve 48 saat (n=24)

5. ve 6. gruplar: 1 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

7. ve 8. gruplar: 5 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

9. ve 10. gruplar: 10 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

11. ve 12. gruplar: 25 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

13. ve 14. gruplar: 50 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

15. ve 16. gruplar: 100 µM TA, 24 ve 48 saat (n=24)

3.5. Hücre canlılığını ve apoptozu belirleme yöntemleri

3.5.1. MTT yöntemi ile hücre canlılığını belirleme

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanından %0.25 tripsin- EDTA (Sigma) ile sökülen hücreler tripan mavisıyla boyama yöntemi ile Roche marka hücre sayım cihazı ile sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. T98G ve LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM tolfenamik asit miktarları ile muamele edildikten sonra MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenil tetrazolium bromid) yöntemi uygulandı. Tolfenamik asitin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi Mossman tarafından tanımlanan MTT (Sigma) spektrofotometrik yöntemi, ile belirlendi (Mossman, 1983). MTT, 5 mg/mL PBS içinde çözünerek hazırlandı ve filtre edildi. Her 250 µl besiyeri için 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri çekilerek 100 µl DMSO eklendi. Kaplar 5-8 dakika çalkalanarak beklendi. 550 nm'de oluşan formazan boya absorbansı spektrofotometrede (Bio Tek) okundu. Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı x 100 / Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı

3.5.2. Apoptoz ölçümü (Flow sitometrik yöntem)

Apoptoz sırasında zardaki lipit çift tabakasının iç tarafında bulunan fosfatidilserin lipit çift tabakasının dış yüzeyine sıçrar. Bu olay apoptozun erken aşamasında oluşur. Floresan bir madde ile (FITC) işaretlenerek apoptotik hücreyi görünür hale getiren anneksin V, fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir. Flow (akım) sitometri bu bağlanma oranını belirlemektedir. Anneksin V nekrotik hücrelere de bağlanır. Bu nedenle

hücreye vital bir boya olan propidiyum iyodür (PI) boyaması da yapılır. Canlı hücreler zarları sağlam olduğu için PI boyası ile boyanmazlar. Canlı hücreler FITC (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / PI (+) olarak ayırt edilir (Zhang, 1997). Tripan mavisi boyama yöntemi ile sayım tamamlandıktan sonra LNCaP hücreleri üzerinde TA'nın apoptoz üzerindeki etkisini araştırmak için Anneksin apoptoz ölçüm kit (Invitrogen) yöntemi doğrultusunda 25 cm²'lik flaslara 1x10⁶ LNCaP hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Etkili bulunan 25, 50 ve 100 µL konsantrasyonları her deney grubunda 3 tekrar olacak şekilde eklenerek 24 saat veya 48 saat inkübasyona bırakıldı. İlaç uygulamalarından sonra flaslardaki supernatanlar tüplere aktarılarak apoptozu belirlemek için flask tabanında kalan hücreler %0,25 tripsin ile 5 dakika yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı. Daha sonra tabandan kopan hücreler supernatantı konan tüplerin içerisine ilave edildi. Tüpler 4 °C'de 1200 devir/dakikada 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte kalan sıvı kısım tüp içinde 2 mL kalacak şekilde atıldı. Tripan mavisıyla boyama yöntemi ile 1 mL'de bulunan hücre sayıları belirlendikten sonra tüpler 2 kez soğuk fosfat tamponu (Phosphate buffered saline, PBS, Sigma) ile 4 °C'de 1200 devir/dakikada 5 dakika döndürüldü. Supernatanlar atıldıktan sonra dipte kalan hücrelerin sayıları binding buffer ile kit prosedürüne uygun olarak 1x10⁶ hücre olacak şekilde ayarlandı. Falcon tüp içerisine 5 µL Anneksin-5-FITC ve 10 µL prodium iyodür (PI) kondu. Bu tüp üzerine 100 µL hücre süspansiyonu eklendikten sonra karıştırıcı ile karıştırılıp 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra üzerine 400 µL binding buffer konarak hücreler resüspanse edildi. Facscalibur akım sitometri cihazında (Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarında) cellquest programında acquisition yapıldı.

3.5.3. Real Time-PCR (RT-PCR) tekniği

1x10⁶ hücre/25 cm² flask olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra etkili bulunan 25, 50 ve 100 µL TA konsantrasyonları eklendi. 24 saatlik deney süresi sona erdiğinde hücreler flaslardan toplandı ve santrifüj işlemi ile pellet haline getirildi. Hemen sonrasında RNA izolasyonu işlemine geçildi.

Hücre Kültüründen Total RNA izolasyonu

En az 1 milyon hücre olmak üzere hücreler toplandı, santrifüj edilerek pelet haline getirildi. Pelet 200 µL PBS ile çözüldü, 400 µL Lysis-Buffer (High Pure RNA Isolation Kit) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Filtreli tüp (High Pure RNA Isolation Kit) sistemine yüklenen karışım 15 saniye 8000 g'de santrifüj ile çevrildi, filtrenin altında kalan kısım atılmış, böylelikle parçalanmış hücrelerdeki total DNA ve RNA filtreye yüklenmiş oldu. Filtrede kalan DNA'yı elimine etmek için DNAase Incubation Buffer (High Pure RNA Isolation Kit) yüklenip, 15 dakika 20 °C'de inkübe edildi. Filtrenin yıkanmasına geçildi: Wash Buffer I (High Pure RNA Isolation Kit) 500 µL

yüklenip, 15 saniye 8000 g'de çevrildi, Wash Buffer II (High Pure RNA Isolation Kit) 500 µL yüklenip, 15 saniye 8000 g'de çevrildi, Wash Buffer II ikinci kere 200 µL yüklenip 2 dakika 13000 g'de çevrildi. Filtre sisteminin altına yeni bir steril tüp takıldı, filtreye 50 µL Elution Buffer (High Pure RNA Isolation Kit) yüklendi ve 8000 g'de 1 dakika çevrildi, filtrede toplanan ve saflaştırılan Total RNA Elution Buffer içinde toplandı. cDNA sentezine kadar -80 °C'de saklandı.

RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması ve cDNA Sentezi

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek için, 1,5 µL RNA Nanodrop 1000 cihazı kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçüldü. cDNA sentezi için her bir örnekten 500 ng total RNA alınıp ve bu miktar ddH₂O ile 9,4 µL'ye tamamlandı. Üzerine 1 µL random primer ve 1 µL oligo-dt primer karışımından eklendi, toplamda 11.4 µL olan karışım 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Her bir örnek için komponent hazırlamak üzere Buffer 5x4 µL, Reverse transkriptaz 1.1 µL, Protoktor RNAase inhibitör 0.5 µL, Deoksinükleotit mix 2 µL ve DTT 1 µL, toplamda 8,6 µL olacak şekilde hazırlandı. Primerlerle inkübe edilen RNA'larla komponent vorteks cihazı kullanılarak karıştırıldı ve 29 °C'de 10 dakika, 48 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Çıkan örnekler -20 °C'de saklandı.

RT- PCR

Kaspaz 9, COX-2 (hedef genler) ve β-aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Nano Lightcycler (Roche Almanya) ile ölçüldü. RT-PCR için gerekli karışım (Tablo 1) hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 1. RT-PCR için miks içeriği

Karışım	Miktar (µL)
Reconstituted primer /probe miks (kaspaz 3,8,9 ve sitokrom C veya β-aktin)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade su	4
cDNA	5
Toplam	20

Toplam 20 µL RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir:

95° C'de	10 dk	
95° C'de	20 sn	
55° C'de	30 sn	50 döngü
72° C'de	20 sn	

RT-PCR işlemi sonuçta Nano Lightcycler bilgisayar programı tarafından tespit edilen ct (cycle treshold) değeri 2 üssü $-\Delta\Delta ct$ hesaplaması ile analiz edildi.

Primer Dizilerinin Hazırlanması

COX-2, kaspaz 9 (hedef genler) ve β -aktin (referans gen) primer dizileri (Roche, Almanya) tarafından tasarlandı.

3.6. İstatistiksel analiz

Verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin belirtici istatistikleri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. MTT, apoptoz ve RT-PCR sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması ANOVA testinin tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. MTT ve apoptoz sonuçlarına göre gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile tespit edilmiştir. P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

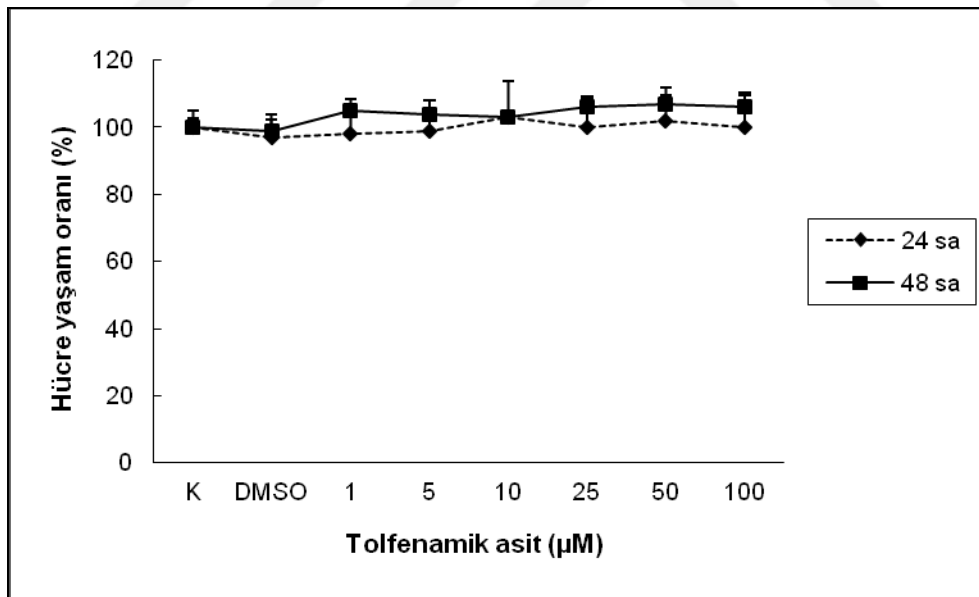
4.1. İlaçların Hücre Canlılığına Etkileri

Tolfenamik asitin hücre canlılığı üzerine olan etkisi MTT yöntemiyle, apoptoz üzerindeki etkisi akım sitometri ve RT-PCR ile belirlendi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

4.1.1. MTT yöntemi bulguları

4.1.1.1. Tolfenamik asitin T-98G hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

En yüksek TA dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO miktarı, hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. T-98G hücrelerine 24 saat süreyle 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA uygulaması sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %98, %99, %103, %100, %102 ve %100 olarak hesaplandı. 48 saatte ise 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA dozlarında elde edilen yaşam oranları sırasıyla %105, %104, %103, %106, %107 ve %106 oldu (Şekil 4.1.1.1.1). TA kullandığımız T-98G hücrelerinin yaşam oranında bir değişime neden olmadığından apoptoz araştırmalarında kullanılmadı.

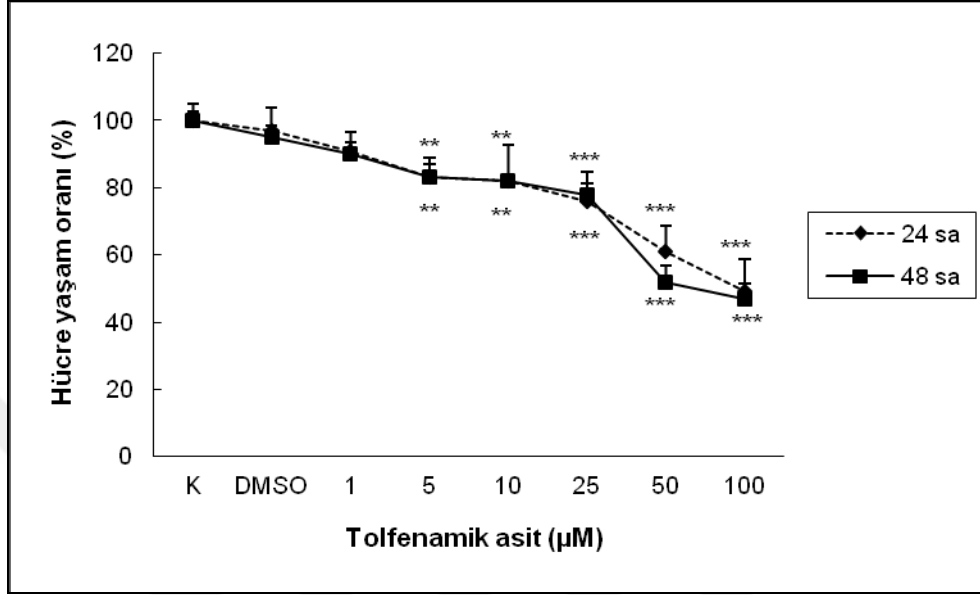


Şekil 4.1.1.1.1 Tolfenamik asitin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM dozlarının 24 ve 48 saat uygulanmasının T-98G hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

4.1.1.2. Tolfenamik asitin LNCaP hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanması

En yüksek TA dozunda çözücü olarak kullanılan DMSO miktarı, hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. LNCaP hücrelerine

24 saat süreyle 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA uygulaması sonucunda elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %91, %83, %82, %76, %61 ve %49 olarak hesaplandı. 48 saatte ise aynı TA dozlarında elde edilen yaşam oranları sırasıyla %90, %83, %82, %78, %52 ve %47 oldu (Şekil 4.1.1.2.1).



Şekil 4.1.1.2.1 Tolfenamik asitin 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM dozlarının 24 ve 48 saat uygulanmasının LNCaP hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Kontrol grubuna göre ** : $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.2. Tolfenamik asitin LNCaP hücrelerindeki apoptoz üzerine etkileri

Kanserli LNCaP hücrelerinde tolfenamik asitin 24 saat uygulanmasından sonra kontrole (%0.60) göre erken apoptoz oranının tablo 4.2.1'de gösterildiği gibi en fazla 100 μM TA dozunda (%17.36) görüldü. Süre 48 saate çıkarıldığında ise bu oran kontrol değerine (%0.48) göre 25 μM TA'da %10.56, 50 μM TA'da %10.18 ve 100 μM TA'da %64.38'e çıktı (Tablo 4.2.2).

Tablo 4.2.1. Tolfenamik asit ile 24 saat muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının kontrole karşılaştırılması. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

LNCaP Hücre yüzdesi	Kontrol	25 μM TA	50 μM TA	100 μM TA	p
Canlı	93.44±2.91	68.77±15.09	65.89±18.55	54.92±19.13	0.076
Erkenapoptik	0.60±0.17	1.79±0.27	3.59±2.06	17.36±8.03	0.004
Geç apoptotik ya da nekrotik	5.41±2.47	21.67±40.94	30.15±14.55	26.39±14.46	0.102

Tablo 4.2.2. Tolfenamik asit ile 48 saat muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen apoptoz sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması. Deneyle 3 kez tekrarlanmıştır.

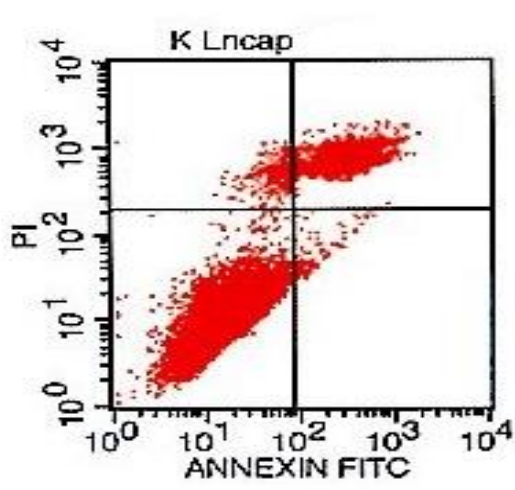
LNCaP Hücre yüzdesi	Kontrol	25 µM TA	50 µM TA	100 µM TA	p
Canlı	90.2±1.62	58.27±10.61	59.76±12.7	24.09±31.35	0.013
Erken apoptik	0.48±0.36	10.56±2.19	10.18±0.2	64.38±38.73	0.014
Geç apoptotik ya da nekrotik	7.98±1.24	14.02±1.74	13.28±1.16	10.29±6.57	0.207

Tablo 4.2.1 ve 4.2.2’de görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerinde TA dozu 25 µM iken erken apoptotik hücre oranının 24 saatte %1.79, 48 saatte ise %10.56 oranında olduğu görülmüştür.

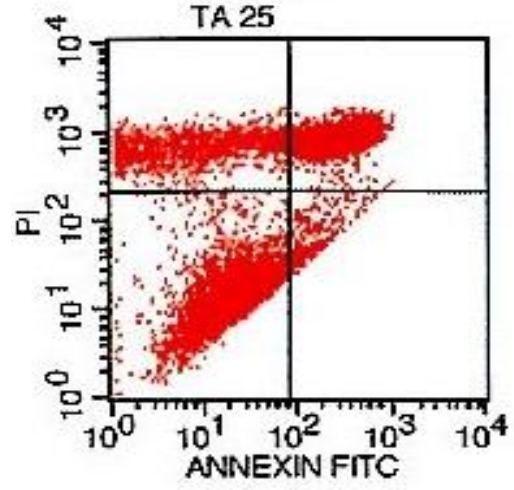
LNCaP hücrelerinde TA dozu 50 µM iken 24 saatlik erken apoptotik hücre oranı %3.59 iken bu oran 48 saat TA uygulanan grupta %10.18 olmuştur.

Tolfenamik asit en yüksek dozda kanserli LNCaP hücrelerinde erken apoptozu uyarmaktadır. Erken apoptoz kontrol (%0.60) değeri 24 saatlik TA uygulaması sonucunda %17.36 değerine çıkmıştır (şekil 4.2.1). 48 saatlik uygulama sonucunda ise erken apoptoz kontrol (%0.48) değeri %64.38 değerine çıkmıştır.

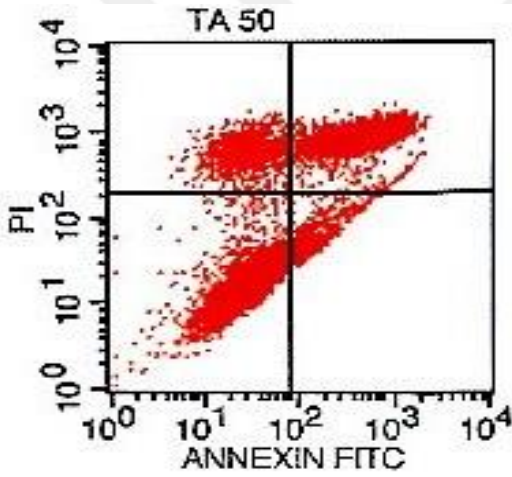
24 saatlik TA uygulaması açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.076$), ancak 48 saatlik TA uygulaması açısından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu gözlenmiştir ($p=0.013^{**}$). Tukey ikili karşılaştırma testi ile bu farklılığın sadece kontrol grubu ile 100 µM TA grubu arasında olduğu tespit edilmiştir ($p=0.008^{**}$).



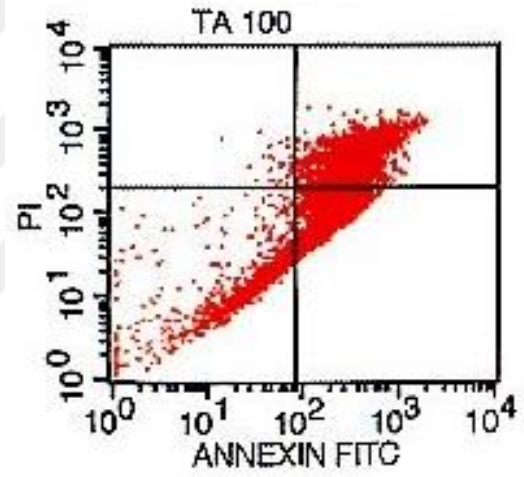
(a)



(b)



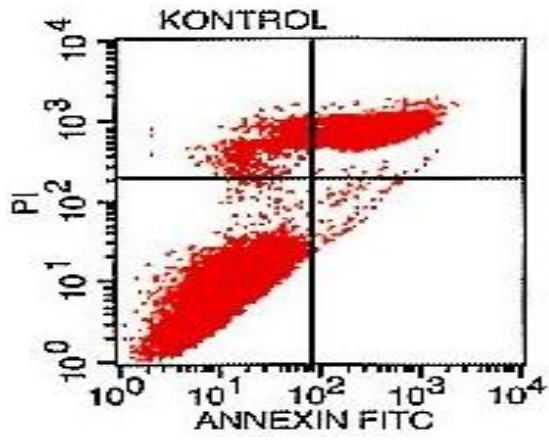
(c)



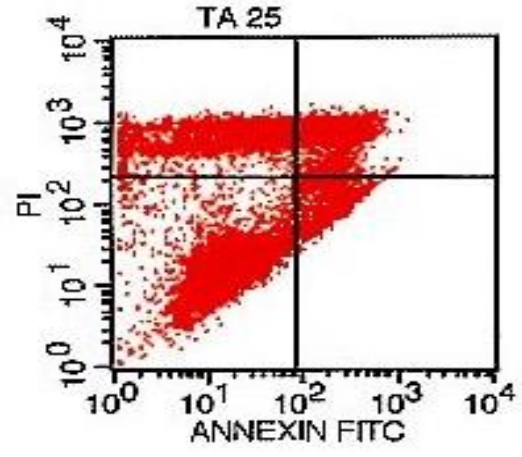
(d)

Şekil 4.2.1 (a, b, c, d). Tolfenamik asit dozlarının (a: kontrol, b: 25, c: 50 ve d: 100 μ M) 24 saat uygulanmasının ardından LNCaP hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdelerinin flow sitometrik yöntemle belirlenmesi.

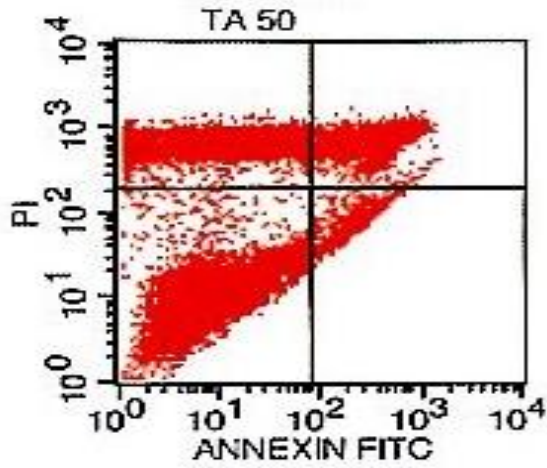
Kanserli LNCaP hücrelerinde 48 saat tolfenamik asit uygulaması sonucu elde edilen erken apoptotik değerleri 24 saate göre daha yüksektir (şekil 4.2.2). Tolfenamik asit doz ve zamana bağlı olarak LNCaP hücrelerinde apoptozu uyarmaktadır.



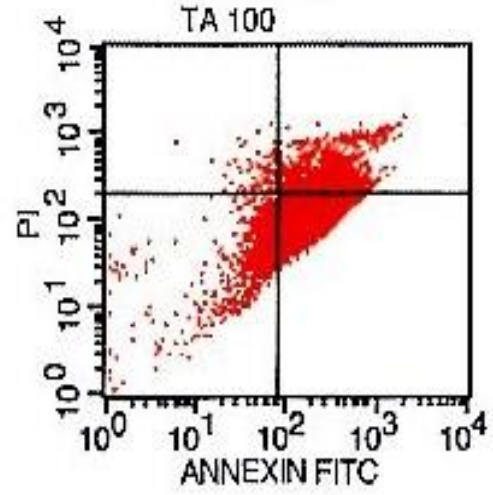
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.2.2 (a, b, c, d). Kanserli LNCaP hücrelerine 48 saat tolfenamik asit (a: kontrol, b: 25, c: 50 ve d: 100 μ M) uygulanması sonrası ortaya çıkan erken apoptotik hücre yüzdeleri.

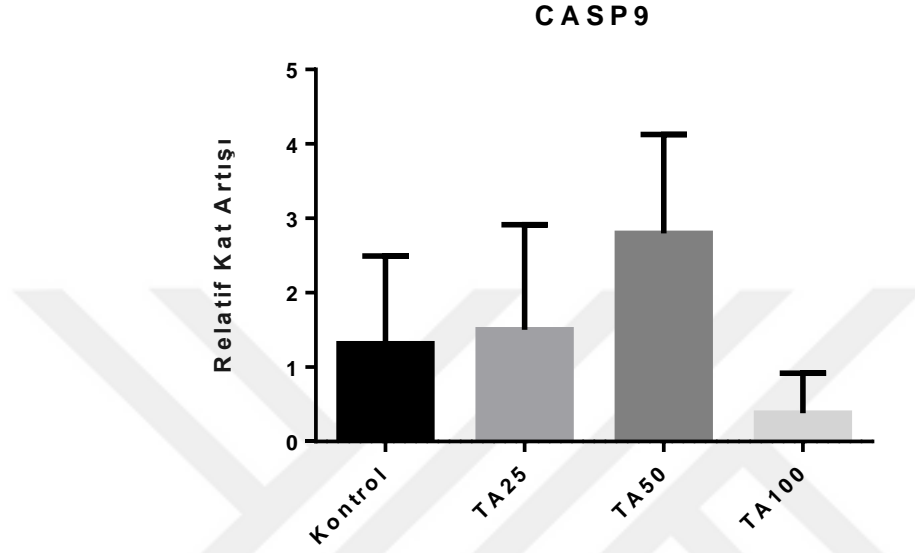
4.3. PCR Sonuçları

4.3.1. Kaspaz-9 aktivitesi

TA, kaspaz-9 düzeyinde, gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemektedir. Bununla birlikte 50 μ M TA grubunda kaspaz-9 aktivitesinin katlı olarak arttığı ve 100 μ M TA grubunda ise kontrole göre katlı azalma olduğu tespit edilmiştir (tablo 4.3.1.1 ve şekil 4.3.1.1).

Tablo 4.3.1.1. Tolfenamik asit ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen kaspaz-9 sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	25 µM TA	50 µM TA	100 µM TA	p
Ortalama relatif kat artışı	1.3±1.1	1.5±1.4	2.8±1.3	0.4±0.5	0.16



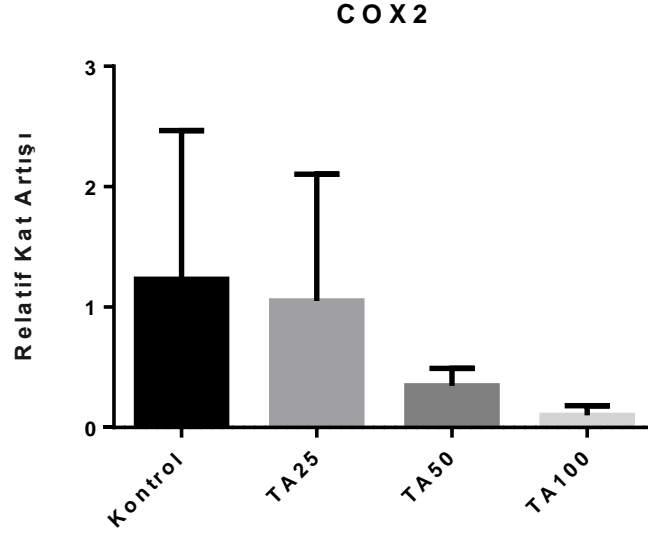
Şekil 4.3.1.1. Kontrol gurubu ve tolfenamik asit (25, 50 ve 100 µM) gruplarının LNCaP hücrelerinde kaspaz-9 aktivitesi.

4.3.2. Siklooksijenaz-2 aktivitesi

TA COX-2 düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemektedir. 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda COX-2 kontrol grubuna göre katlı olarak azalmıştır (tablo 4.3.2.1 ve şekil 4.3.2.1).

Tablo 4.3.2.1. Tolfenamik asit ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde belirlenen siklooksijenaz-2 sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	25 µM TA	50 µM TA	100 µM TA	p
Ortalama relatif kat artışı	1.2±1.2	1.0±1.0	0.35±0.14	0.10±0.08	0.33



Şekil 4.3.2.1. Kontrol gurubu ve tolfenamik asit (25, 50 ve 100 μ M) gruplarının LNCaP hücrelerinde siklooksijenaz-2 düzeyi.

5.TARTIŞMA

TA'nin T-98G hücrelerinde sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT spektrofotometrik yöntemi ile yapılan denemelerde, T-98G hücrelerinin yaşam oranları üzerinde 24 ve 48 saatte herhangi bir etkisi saptanamadı. Bu nedenle T-98G hücreleri akım sitometri ve RT-PCR ile incelenmedi.

LNCaP hücrelerinde 24 saat süreyle 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA verilmesi sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları sırasıyla %91, %83, %82, %76, %61 ve %49 olarak belirlendi. 48 saatte ise aynı TA dozlarında elde edilen yaşam oranları sırasıyla %90, %83, %82, %78, %52 ve %47 oranlarında idi. Sonuçlarımız, TA ile muamele edildiğinde LNCaP hücrelerinin yaşayabilirliğinin kayda değer bir düzeyde azaldığını ve bu azalmanın doza bağlı olduğunu göstermiştir. Bulgularımızı destekleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda TA'nın, pankreas (Abdelrahim, 2006a; Abdelrahim, 2006b), özefagus (Papineni, 2009), akciğer (Colon, 2011) ve ovaryum kanserlerinde (Basha, 2011) hücre çoğalmasını, tümör büyümesini ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir. Sung ve arkadaşlarının baş ve boyun bölgesine ait skuamoz kanser hücre dizilerini (KB ve SCCQLL1 kodlu ağız kanser hücre dizileri, HN3 larinks ve FaDu larinks altı kanser hücre dizileri) kullanarak yaptıkları çalışmada TA'nın etkisini MTT sitotoksikite testi ve apoptoz yönünden değerlendirmişlerdir. TA'nın 16 saatte diğer NSAİİ ile kıyaslandığında kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin daha fazla ve apoptoz için daha güçlü bir uyarıcı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca vurgulamak gerekir ki, TA normal keratinosit hücrelerinde 100 μM 'a kadar çok düşük toksisite göstermiştir. Sadece daha yüksek dozlarda ölüm oranını arttırmıştır (Sung, 2012). Colon ve arkadaşlarının akciğer kanseri in vivo fare modellerinde yaptıkları çalışmada 25 ve 50 mg/kg TA'nın A549 ve CRL5803 akciğer kanser hücrelerinde doza bağlı olarak hücre çoğalması ve hücre canlılığını inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Colon, 2011). TA diğer NSAİİ'lerle kıyaslandığında iyi tolere edilebilen düşük gastrik yan etkiye ve yüksek terapötik indekse sahip bir ilaçtır. Bu ilacın antipiretik ve analjezik etkileri hem birçok hayvan deney modelleri ile hem de migren, romatoid artrit ve osteoartritin uzun süreli tedavilerinde kanıtlanmıştır (Colon, 2011).

TA'nın LNCaP hücrelerini öldürme mekanizmasını belirleyebilmek için yapılan erken apoptoz ölçümlerinde, apoptozun doza ve süreye bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlendi. 24 saat TA uygulamasından sonra kontrol ile kıyaslandığında (%0.60) erken apoptoz oranı en fazla 100 μM TA konsantrasyonunda (%17.36) görüldü (tablo 4.2.1). Süre 48 saate çıkarıldığında ise 25 μM TA'da %10.56, 50 μM TA'da %10.18, 100 μM TA'da %64.38'e çıktı. LNCaP hücrelerinde 48 saat sonunda elde edilen erken apoptotik değerler özellikle 25 ve 100 μM dozlarında 24 saate göre daha yüksektir (tablo 4.2.2). Bu durum TA'nın doz ve zamana bağlı olarak LNCaP hücrelerinde apoptozu uyardığı şeklinde yorumlanabilir. Yapılan çalışmalarda TA'nın ayrıca kolorektal kanser hücrelerinde ve metastaz ile

tümör gelişimini araştıran pankreatik kanser modellerinde apoptozu uyardığını ortaya koymuştur (Abdelrahim, 2006(a); Abdelrahim, 2007(b); Lee, 2008). Ancak prostat kanser hücrelerinin apoptozunda TA veya onun moleküler düzeydeki etkisi hakkında yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır (Choi, 2011). Mitokondriyal hasarda mitokondriyal zar potansiyeli kaybolur ve mitokondriyal iç zar yüzeyinden sitokrom C gibi proteinler salınır. Mitokondrinin doğrudan ya da dolaylı düzensizlikleri apoptotik yolağı uyarabilir. TA'nın mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını önemli oranda uyardığı ve böylece TA nedenli apoptozda mitokondriyal membran hasarına karıştığı gösterilmiştir (Sung, 2012).

Apoptozun oluşum şekli tam olarak açıklanamamasına rağmen, apoptoz ile ilgili belirlenen en önemli olay kaspazların aktivasyonudur (Choen, 1997, Lee, 2000). Birçok vakada kaspaz aktivasyonu hücre apoptozunu tamamlamak için kaçınılmazdır (Salvesen, 2002). Apoptozu karışan proteinleri de içeren DNA metabolizması ve onarımı, hücre çoğalması ve hücre hayat döngüsünün düzenlenmesi (Fischer, 2003) ile ilgili yaklaşık 400 kaspaz substratı tanımlanmış ve bu sayı tümör baskılayıcı proteinlerin de eklenmesiyle hala artmaktadır (Lin, 2010, Shen, 2010). Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 apoptozu başlatır (Ozawa, 2002, Wang, 2000). Bulgularımızda 50 µM TA konsantrasyonunda kaspaz-9 aktivitesinin katlı olarak arttığı tespit edilmiştir (tablo 4.3.1.1 ve şekil 4.3.1.1).

Çalışmamızda 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda COX-2 kontrol grubuna göre katlı olarak azalmıştır (tablo 4.3.2.1 ve şekil 4.3.2.1). İnflamasyonun en önemli araçlarından biri olan COX-2 molekülünün prostat kanseri gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. COX-2, PG biyosentezinde görev alır. İnflamasyon, doğum, ovulasyon gibi PG yapımına geçici olarak ihtiyaç duyulduğu hallerde işlev görmektedir (Bakhle, 2001). Klinik araştırmalardan elde edilen sonuçlar, COX-2'nin yukarı düzenlenmesinin kanser oluşumundaki temel aşamalardan biri olduğunu düşündürmektedir (Prescott, 2000). COX yolları hücre çoğalmasında ve yeni damar oluşumunda anahtar düzenleyicilerdir. Bu nedenle klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, COX baskılayıcı ilaçların potansiyel antikanser ilaçlar olarak kullanılması yönünde çalışmalar devam etmektedir (Hyde, 2002, Ölgün, 2002). NSAİİ'nin kullanımının bazı kanserlerin gelişme riskini, prostat kanseri ve metastaz riskini azalttığı bilinmektedir (Coogan, 2009, Leitzmann, 2000). NSAİİ'nin antiproliferatif özelliklerine COX baskılanmasının yanında apoptotik yollarda ve antianjiojenik aktivitede artışlar eşlik eder (Tarnawski and Jones, 2003; Lincova, 2009). Nelson ve ark. (2000) yaptıkları araştırmada günlük düzenli olarak ibuprofen veya aspirin alınımının prostat kanseri riskini %66 oranında azalttığını göstermişlerdir. Bu etki COX-2 kısıtlamasına bağlı olabilir. COX-2, arasıdonik asidi proinflatuar PG'lere dönüştüren COX enziminin izoformu olup, bu enzimin prostat kanseri gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gupta, 2000, Nelson, 2000). COX baskılanmasının kanser oluşumunu azalttığına ve hücrelerin çoğalmasını engellediğine yönelik çalışmalar oldukça artmıştır (Ding,

2003).

TA vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 1'in (VEGFR1) ifadesini de azaltır ki bu durumu spesifik proteinleri azaltarak düzenlenmesi yoluyla yapmaktadır ((Abdelrahim, 2006(a); Abdelrahim, 2007(b)).

Kanser oluşumunda ya da kanserin yayılmasında COX-2 yolaklarının aşırı uyarılması göz önüne alındığında, çalışmamızda TA'nın ilk kez kanserli LNCaP hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı etkilerinin tespit edilmesi önemlidir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda TA, T-98G hücrelerinde MTT spektrofotometrik yöntem ile yapılan denemelerde, herhangi bir antiproliferatif etki yaratmamıştır. Oysa doz ve zamana bağlı olarak kanserli LNCaP hücrelerinde hücre çoğalmasını baskıladığı ve erken apoptozu uyardığı ilk kez bu çalışmada belirlendi. TA ve onunla ilişkili bileşiklerin prostat kanseri ve diğer bazı kanserlerin olası klinik tedavisi için yeni bir ilaç sınıfı olarak araştırılması gerektiğine inanıyoruz.



7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdelrahim, M., Baker, C.H., Abbruzzese, J.L., et al. (2007). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 expression by specificity proteins 1, 3, and 4 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*; 67(7): 3286–94.

Abdelrahim, M., Baker, C.H., Abbruzzese, J.L., Safe, S. (2006a). Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation. *J Natl Cancer Inst*; 98(12): 855–68.

Abdelrahim, M., Safe, S., Baker, C., Abudayyeh, A. (2006b). RNAi and cancer: Implications and applications. *J RNAi Gene Silencing*; 2:136–145.

Andersen, K.V., Larsen, S., Alhede, B., Gelting, N., Buchardt, O. (1989). Characterization of two polymorphic forms of tolfenamic acid, N-(2-methyl-3-chlorophenyl) anthranilic acid: Their crystal structures and relative stabilities. *J Chem Soc, Perkin Trans*;2:1443–1447.

Andriole, G.L., Roehrborn, C., Schulman, C., Slawin, K.M., Somerville, M., Rittmaster, R.S. (2004). Effect of dutasteride on the detection of prostate cancer in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*;64(3):537–541; discussion 542–543.

Bakhle, Y.S. (2001). COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *Br J Pharmacol*;134(6):1137-50.

Balbay, M.D. (2008). Prostat. Güneş Kitapevi, Ankara. s 1-4.

Banasiak, K.J. and Haddad, G.G. (1998). Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797: 295-304.

Basha, R., Baker, C.H., Sankpal, U.T., Ahmad, S., Safe, S., Abbruzzese, J.L, Abdelrahim, M. (2011a). Therapeutic applications of NSAIDS in cancer: Special emphasis on tolfenamic acid. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:797–805.

Basha, R., Ingersoll, S.B., Sankpal, U.T., Ahmad, S., Baker, C.H., Edwards, J.R., Holloway, R.W., Kaja, S., Abdelrahim M. (2011b). Tolfenamic acid inhibits ovarian cancer cell growth and decreases the expression of c-Met and survivin through suppressing specificity protein transcription factors. *Gynecologic Oncology*, 122:163–170.

Berens, M.E., Rutka, J.T., Rosenblum, M.L. (1990). Brain tumor epidemiology, growth and invasion. *Neurosurg Clin North Am* 1:1-18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Beytur, A., Tekin, S., Keleştemur, T., Ergin, Z., Sandal, S. (2011). Yeni sentezlenen bir tiyosemikarbazon türevinin prostat kanseri hücre kültürleri üzerine antikanserojenik özelliklerinin belirlenmesi: In vitro bir çalışma. F.Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.25(1): 25-32.

Bouwman, P., Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. Mol Cell Endocrinol;195(1-2):27-38.

Brawley, O.W., Knopf, K., and Thompson, I. (1998). The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. Seminars in urologic oncology, 16, 193-201.

Burger, P.C., Kleihues, P. (1989). Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies. Cancer; 63:2014-2023.

Calabro, F., Sternberg, C.N. (2007). Current Indications for Chemotherapy in Prostate Cancer Patients. European Urology. 51(1):17-26.

Castelo, J.E., MD, PhD, Bart R.D., Dipernac.a., MD, Sievers E.M., MD, and bremner R.M., MD, PhD, (2003). Lung Cancer and Cyclooxygenase-2.

Chang, S. S., Reuter, V. E., Heston, W. D. W., Hutchinson, B., Grauer, L. S., and Gaudin, P. B. (2000). Short term neoadjuvant therapy does not affect prostate specific membrane antigen expression in prostate tissues. Cancer 88, 407-415.

Cho, S.D., Jiang, C., Malewicz, B., et al. (2004). Methyl selenium metabolites decrease prostate-specific antigen expression by inducing protein degradation and suppressing androgen-stimulated transcription. Mol Cancer Ther; 3(5): 605-11.

Choen, G.M. (1997). Caspases, the executioners of apoptozis. Biochem J; 326:1 -16.

Choi, E.S., Shim, J.H., Jung, J.Y., Kim, H.J., Choi, K.H., Shin, J.N., Ae, J.S., Cho N.P., and Cho S.D. (2011). Apoptotic effect of tolfenamic acid in androgen receptor-independent prostate cancer cell and xenograft tumor through specificity protein 1. Cancer Sci; 102: 742-748.

Colon, J., Basha, M.R., Madero-Visba, I R., Konduri, S., Baker, C.H., Herrera, L.J., Safe, S., Sheikh-Hamad, D., Abudayyeh, A., Alvarado, B., Abdelrahim, M. (2011). Tolfenamic acid decreases c-Met expression through Sp proteins degradation and inhibits lung cancer cells growth and tumor formation in orthotopic mice. Invest New Drugs;29(1):41-51.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Coogan, P.F., Rosenberg, L., Palmer, J.R., Strom, B.L., Zauber, A.G., Stolley, P.D., et al. (2000) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of digestive cancers at sites other than the large bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;9(1):119-23.

Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., et al. (2009) Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: An international consensus statement. *Lancet Oncol*; 10: 501– 507.

DeAngelis, L. (2001). Brain tumors. *N.Engl J Med.*; 344: 114-123.

Ding, X.Z., Hennig, R., and Adrian, T.E. (2003). Lipoxgenase and cyclooxygenase metabolism: New insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer, *Molecular Cancer*, 2, 10, 1-12.

Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I. (2004). Sesterhenn Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: World Health Organization Classification of Tumours, 159-214.

Elwood, P.C., Gallagher, A.M., Duthie, G.G., Mur, L.A., Morgan, G. (2009). Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet*; 373:1301– 1309.

Englot, D.J., Berger, M.S., Chang, E.F., et al. (2012). Characteristics and treatment of seizures in patients with high-grade glioma: a review. *Neurosurg Clin N Am*; 23: 227-35, vii-viii.

Epstein, J.I. (1995). Diagnostic criteria of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Human Pathology*; 26 (2): 223-9.

Epstein, J.I., Allsbrook, W.C.J., Amin, M.B., Egevad, L.L. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 29(9): 1228-42.

Eskerod, O. (1994). Gastrointestinal tolerance studies on tolfenamic acid in humans and animals. *Pharmacol Toxicol*; 75(Suppl. 2):44–48.

Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10:76–100.

Fornari, F.A., Randolph, J.K., Yalowich, J.C., Ritke, M.K., and Gewirtz, D.A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular pharmacology*, 45, 649-656.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Gann, P.H., Hennekens, C.H., Ma, J., Longcope, C., and Stampfer, M.J. (1996). Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 1118-1126.

Gleason, D.F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*, 23(3): 273-9.

Gronberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, 361, 859-864.

Guess, H.A., Arrighi, H.M., Metter, E.J., and Fozard, J.L. (1990). Cumulative prevalence of prostatism matches the autopsy prevalence of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate*, 17, 241-246.

Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D.G., Mukhtar, H. (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate* ;42(1):73-78.

Günes, H.V. (2014). *Moleküler Hücre Biyolojisi*, 4. Baskı, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.

Hudes, G.R., Kosierowski, R., Greenberg, R., Ramsey, H.E., Fox, S.C., Ozols, R.F., McAleer, C.A., and Giantonio, B.J. (1995). Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Investigational new drugs*, 13, 235-240.

Hyde, C.A.C., and Missailidis, S. (2009). Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis, *International Immunopharmacology*, 9, 701-715.

İnci, O. (1995). *Ürogenital tümörler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 106-34.

İzmirli, M. (2010). *Prostat Kanserinin ELAC2 ve SRD5A2 Genlerindeki Polimorfizmler ile İlişkinin Araştırılması* 8 Ocak 2010 Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi Adana

Jonsson, J.G., Sissung, T.M., and Figg, W.D. (2009). A genomic strategy for predicting androgen receptor activity in prostate tumors. *Cancer biology & therapy*, 8, 2002-2003.

Karen, R., Kostyantyn, K., Mehis, P., Harnisha, D., Nathalie, H.V., Dohadwala, M., Ming Liu., Xiaoyan, C., Figlin, R., Mao J.T., Strieter, R., Sharma, S., Dubinet, S.M. (2004). Multifaceted roles of cyclooxygenase-2 in lung, *DRUG resistance Updates* ,169-184.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Karlsson, U.L., Leibel, S.A., Wallner, K., Davis, L.W., Brady, L.W. (2004). Brain. İn: Principles and Practice of radiation oncology. (eds): Perez C.A,Brady L.W. J.B Lippincot Company,Philadelphia, Ch 28:791-838.

Kaygusuz, G., Tulunay, O., Baltaci, S., and Gogus, O. (2007). Microvessel density and regulators of angiogenesis in malignant and nonmalignant prostate tissue. International urology and nephrology, 39, 841-850.

Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W.D. (2001). Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol 60: 422-429.

Kelly, P.J., Dumas-Duport, C., Kispert, D.B., et al. (1987). Imaging-based stereotactic serial biopsies in untreated glial neoplasms. J Neurosurg; 66:865-874.

Kemerli, Ç., Taşkın, M.M., Sütpideler, N., Kaplan, N., ve Ethemoğlu, B. (2005). Histopathology, invasion, migration and tumorigenicity in the C6 rat glioma model, Turkish Neurosurgery, 15, 3, 109-115.

Kim, Y.H., Kim, C.Y. (2012). Current surgical management of insular gliomas. Neurosurg Clin N Am; 23:199-206, vii.

Kirby, R.S. (2013). Anatomy and embriology. İn: Kirby RS, ed.An atlas of prostatic diseases, 3rd edn.London: Parthenon: 13.

Kleihues, P., Cavenee, W.K., eds. (2000). Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon, France: İnternational Agency for Research on Cancer.

Konduri, S., Colon, J., Baker, C.H., Safe, S., Abbruzzese, J.L., Abudayyeh, A., Basha, M.R., Abdelrahim, M. (2009). Tolfenamic acid enhances pancreatic cancer cell and tumor response to radiation therapy by inhibiting survivin protein expression. Mol Cancer Ther;8(3):533-542.

Krongrad, A., Droller, J.M. (1993). Anatomy of the prostate. W.B. Saunders Company.

Korkud G., Karabay, K. (1993). Üroloji. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi, 584-92.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Koyunoğlu, F., Tekin, S., Konar, V., Sandal, S. (2013). İnsan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerine apelin-13'ün etkilerinin araştırılması: In vitro bir çalışma. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.;1(1):23-8.

Kromer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. Fedn Am. Soc. exp. Biol. J. 9: 1277-1287.

Lee, D., Scott, A.L., Jerry, A.L. (2000). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionally. J Biol Chem; 275:16007-16014.

Lee, S.H., Bahn, J.H., Choi, C.K., et al. (2008). ESE-1 / EGR-1 pathway plays a role in tolfenamic acid-induced apoptosis in colorectal cancer cells. Mol Cancer Ther; 7(12): 3739-50.

Lee, S.O., Ma, Z., Yeh, C.R., Luo, J., Lin, T.H., Lai, K.P., Yamashita, S., Liang, L., Tian, J., Li, L., et al. (2013) New therapy targeting differential androgen receptor signaling in prostate cancer stem/progenitor vs. non-stem/progenitor cells. Journal of Molecular Cell Biology, 5, 14-26.

Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J., Ma, J., Chan, J.M., Colditz, G.A., Willett, W.C., Giovannucci, E. (2002). Aspirin use in relation to risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 11:1108-11.

Lessick, M. and Katz, A. (2006). A genetics perspective on prostate cancer. Urologic nursing, 26, 454-460.

Levin, V.A., Leibel, S.A., Gutin, P.H., DeVita, V.T.J, Hellmar, S., Rosenberg, S.A., eds (2001). Neoplasms of the central nervous system In Cancer: Principles and Practice of Oncology.6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp 2100-60.

Lin, S.Y., et al. (2010). HLJ1 is a novel caspase-3 substrate and its expression enhances UV-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma. Nucleic Acids Res. 38:6148-6158.

Lin, H.P., Lin, C.Y., Hsiao, P.H., Wang, H.D., Sheng Jiang, S., Hsu, J.M., Jim, W.T., Chen, M., Kung, H.J., and Chuu, C.P. (2013). Difference in Protein Expression Profile and Chemotherapy Drugs Response of Different Progression Stages of LNCaP Sublines and Other Human Prostate Cancer Cells. PLoS ONE 8(12).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Lincova, E., Hampl, A., Pernicova, Z., Starsichova, A., Krcmar, P., Machala, M., Kozubik, A., Soucek, K. (2009). Multiple defects in negative regulation of the PKB/Akt pathway sensitise human cancer cells to the antiproliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem pharmacol*;78(6):561–572.

Liu, X.Z., Xu, X.M., Hu, R., Du, C., Zhang, S.X., McDonald, J.W., Dong, H.X., Wu, Y.J., Fan, G.S., Jacquin, M.F., Hsu, C.Y., Choi, D.W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 17: 5395-5406.

Lou, J., Lenke, L.G., Ludwig, F.J, O'Brien, M.F. (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36: 683-690.

Lowitz, B.B., Casciato, D.A. (2007). *Klinik Onkoloji El Kitabı*, Palme Yayıncılık, Ankara, 762.

Maity, A., Pruitt, A.A., Judy, K.D., Phillips, P., Abeloff, M.D., Armitage, J.O., Niederhuber, J.E., Kastan, M.B., McKenna, W.G., eds. (2004). *Cancer of the central nervous system*. In *Clinical Oncology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone, 1347-1431.

Masahiko, T., Sunao, K., Shingo, T., Hitoshi, S., Masatsugu, H., Raymond D. (1998). *Cell*, vol. 93,705-716.

Mattox, A.K., Lark, A.L., Adamson, D.C. (2012). Marked response of gliomatosis cerebri to temozolomide and whole brain radiotherapy. *Clin Neurol Neurosurg*; 114:299-306.

McLeod, D.G. (2003). Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology*:61;3-7.

Michael, R., Pins, M.D. (2002). *Differential diagnosis in surgical pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 54 0-6.

Miyamoto, K.K., McSherry, S.A., Dent, G.A., Sar, M., Wilson, E.M., French, F.S., Sharief, Y., and Mohler, J.L. (1993). Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *The Journal of urology*, 149, 1015-1019.

Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immun Method* 65, 55-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Mostofi, F.K., Sesterhenn, I., Sobin, L.H. (1980). Histological typing of prostate tumours: international histological classification of tumours. No. 22. Geneva: World Health Organization.

Nahleh, Z.A. (2006). Hormonal therapy for male breast cancer: A different approach for a different disease. *Cancer treatment reviews*, 32, 101-105.

Nalabolu, M.R., Palasamudram, K., Jamil, K. (2014). Adiponectin and Leptin Molecular Actions and Clinical Significance in Breast Cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.*; 8(1):31-40.

Nelson, J.E., Harris, R.E. (2000). Inverse association of prostate cancer and non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): results of a case-control study. *Oncol Rep*;7(1): 169-70.

O'Keefe, D. S., Uchida, A., Bacich, D. J., Watt, F. B., Martorana, A., Molloy, P. L., et al. (2000). Prostate-specific suicide gene therapy using the prostate-specific membrane antigen promoter and enhancer. *Prostate* 45, 149–157.

Oh, W.K. (2000). Chemotherapy for patients with advanced prostate carcinoma: a new option for therapy. *Cancer*. 88(12 Suppl): 3015-21.

Ozawa, H., Keone, R.W., Marcilla, A.E. (2002). Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*; 177:306-313.

Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31, 193-214.

Papineni, S., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lee, S.O., Burghardt, R., Abudayyeh, A., Baker, C., Herrera, L., Safe, S. (2009). Tolfenamic acid inhibits esophageal cancer through repression of specificity proteins and c-Met. *Carcinogenesis*;30(7):1193–1201.

Paul, R. and Breul, J. (2000). Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: Incidence and clinical significance. *Drug Safety* 23, 381–390.

Peehl, D. M. (1995). Prostate specific antigen role and function. *Cancer Suppl*. 75, 2021–2026.

Polard, T.D., Earnshaw, W.C., (2004). *Cell Biology, An Imprint of Elsevier*, Pennsylvania, 813s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Polascik, T. J., Oesterling, J. E., and Partin, A. W. (1999). Prostate specific antigen: A decade of discovery—what have we learned and where are we going. *J. Urol.* 162, 293–306.

Prehn, R.T. (1999). On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer research*, 59, 4161-4164.

Prescott, S.M., Fitzpatrick, F.A. (2000). Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*;1470(2): M69-78.

Presti, J.R. (2000). Neoplasm of the prostate gland. In: Tanagho EA, McAninch JW(Eds.). *Smith's general urology*. 15th ed. San Francisco: The McGraw-Hill Companies:399-421.

Rambeaud, J. J. (1999). Intermittent complete androgen blockade in metastatic prostate cancer. *Eur. Urol.* 35 (Suppl 1), 32–36.

Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., et al., (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 869-874.

Rejholec, V., Vapaatalo, H., Tokola, O., Gothoni, G. (1979). Tolfenamic acid in the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl*; 24: 9–12.

Rosai, J. (2004). *Rosai and Ackerman's surgical pathology*. Volume One. 9.ed. Newyork: Mosby; 1361-412.

Ross, R., Bernstein, L., Judd, H., Hanisch, R., Pike, M. and Henderson, B. (1986). Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *Journal of the National Cancer Institute*, 76, 45-48.

Safe, S., Kim K. (2004) Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins. *Prog Nucleic Acid Res. Mol Biol*; 77:1–36.

Salvesen, G.S. (2002). Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 38:9 –19.

Sanche-Alcazar, J.A., Bradbury D.A., Pang L., Knox A.J. (2003). *Lung Cancer* 40 (2003)33-44.

Satya, P., Xi, L., and Stephen, S. (2014). Tolfenamic Acid Inhibits Colon Cancer Cell and Tumor Growth and Induces Degradation of Specificity Protein (Sp) Transcription Factors. *Molecular Carcinogenesis* 53: E53–E61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Schwarz, C., Lubbert, H., Rahn, W., Schonfeld, N., Serke, M. and Loddenkemper, R. (2004). Medical thoracoscopy: hormone receptor content in pleural metastases due to breast cancer. *The European respiratory journal*, 24, 728-730.

Sciarra, A., Casale, P., Colella, D., Di Chiro, C., and Di Silverio, F. (1999). Hormone- refractory prostate cancer? Anti-androgen withdrawal and intermittent hormone therapy. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 33, 211–216.

Shan, Z., Vasan, Y., William, G.N., William, B.I., Angelo, M.D.M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective, *Cancer Letters* 215(2004) 1-20.

Shen, S.M., et al. (2010). Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis.* 31:419–426.

Shin, T., Sumiyoshi, H., Matsuo, N., Satoh, F., Nomura, Y., Mimata, H., Yoshioka, H. (2005). Sp1 and Sp3 transcription factors upregulate the proximal promoter of the human prostate-specific antigen gene in prostate cancer cells. *Arch Biochem Biophys*; 435(2):291–302.

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. *Cancer statistics*, (2013). *CA: a cancer journal for clinicians*, 63, 11-30.

Small, E.J., Srinivas, S., Egan, B., McMillan, A. and Rearden, T.P. (1996). Doxorubicin and dose-escalated cyclophosphamide with granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of hormone-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 14, 1617-1625.

Steiner, M.S., Pound, C.R. (2003). Phase IIA clinical trial to test the efficacy and safety of Toremifene in men with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Clin Prostate Cancer*;2(1):24–31.

Sternberg, S.S., Antonioli, D.A., Carter, D., Mills, S. E., Oberman, H.A. (1999). *Diagnostic surgical pathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company: 1899-934.

Strom, S.S., Yamamura, Y., Duphorne, C.M., Spitz, M.R., Babaian, R.J., Pillow, P.C., Hursting, S.D. (1999). Phytoestrogen intake and prostate cancer: A case-control study using a new database. *Nutr Cancer*;33(1):20–25.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Su, S.L., Huang, I.P., Fair, W.R., Powell, C.T., and Heston, W.D.W. (1995). Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: Ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer Res.* 55, 1441–1443.

Sukhatme, V.P., Cao, X.M., Chang, L.C., et al. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*; 53:37–43. [PubMed: 3127059]

Sung, U.K., Yoo S.S., Hye, S.H., Seung, J.B., Seong-Ho L., Chul- Ho K. (2012). Tolfenamic Acid Induces Apoptosis and Growth Inhibition in Head and Neck Cancer: Involvement of NAG-1 Expression *PLoS ONE.* 7(4).

Şeftalioğlu A. (1998). Genel & Özel İnsan Embriyolojisi, üçüncü baskı Ankara Tıp&TeknikYayıncılık.

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser_istatistikleri.html access date 11.03.2014.

Tanagho, E. A., McAninch, J.W. (1995). *Smith's general urology.* 4.ed. San Francisco: A. Simon & Schuster Company, 410-27.

Tang, D.G., Porter, A.T. (1997). Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate*; 32(4): 284–93.

Tarnawski, A.S., Jones, M.K. (2003). Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: Molecular mechanisms and clinical implications. *J Mol Med (Berlin, Germany)*;81(10):627–636.

Thompson, I.M., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Miller, G.J., Ford, L.G., Lieber, M.M., Cespedes, R.D., Atkins, J.N., Lippman, S.M., Carlin, S.M., Ryan, A., Szczepanek, C.M., Crowley, J.J., Coltman, C.A.J. (2003). The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med*;349(3):215–224.

Tmothy, H., Bishop-bailey, D., Liu, C.H., Schaefers, H.J., Trifan, O.C. (1998). Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes, *The International Journal of biochemistry and cell Biology* 31 (1999) 551-557.

Tunçkiran, A., Bozlu, M. (2007). Hormona dirençli prostat kanseri hastalarında dozetaksel, estramustin fosfat ve karboplatin kombinasyonunun Faz-2 çalışması. *European Urology*, 51:1252-58.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Umesh, T.S., Maen, A., Sarah, F.C., Lee, C.M., Madero-Visbal, R., Colon, J., Smith, J., Safe, S., Maliakal, P., and Basha, R. (2012). SmallMoleculeTolfenamicAcid Inhibits PC-3 Cell Proliferation and Invasion InVitro, and TumorGrowth in OrthotopicMouseModel for Prostate Cancer. *The Prostate* 72:1648-1658.

Villers, A., Mcneal, J.E., Freiha, F.S., et al. (1993). Invasion of Denonvillers's fascia in radical prostatectomy specimens. *J urol*; 149:793.

Vis and Schroder, F.H. (2009). Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. *BJU Int.*;104(4):438-48.

Walsh, P.C. (2002). *Campbell's urology*. Vol.4. Philadelphia: Saunders, 3003-82.

Walsh, P.C., Retik, B.A., Vaughan, E.D., Wein, A.J. (2002). *Campbell's urology*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Co, 3001-221.

Wang, D., Dubois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*; 29:781-788.

Wang, G., Reed, E., Li, Q.Q. (2004). Apoptosis in prostate cancer: progressive and therapeutic implications (Review). *Int J Mol Med*; 14(1): 23-34.

Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase can you tell the difference? *Trends Neuroscience*; 23:20-26.

Wankya, B.M., Awadh, S., Mwai, S.J. (1981). Tolfenamic acid and ibuprofen in rheumatoid arthritis: a double-blind cross over study. *East Afr Med J*; 58(8): 622-5.

Wingrave, J.M., Schaecher, K.E., Sribnick, E.A. (2003). Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Res*.73: 95-104.

Zachariae, E., Sylvest, J. (1972). Osteoarthritis of the knee treated with tolfenamic acid. *Scand J Rheumatol*; 1(3): 97-9.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R. and Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V, *Biotechniques*, 23, 525-531.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Rifat ERTEKİN

Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1981 Diyarbakır

Uyruğu : TC

Medeni durumu : Evli

İletişim adresleri : Yeni Bağlar Mah. Yılmaz Sok. No: 48/6 Tepebaşı
ESKİŞEHİR

Eğitim Durumu

İlköğretim : Bozüyük Cumhuriyet ilköğretim Okulu

Ortaokul ve lise : Bozüyük Mustafa Şeker Anadolu Lisesi

Üniversiteler : Pamukkale Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon
Yüksekokulu (Fizyoterapi Bölümü), 2004.

Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Kamu Yönetimi Bölümü, 2014

Mesleki Deneyim : 2004 yılından beri fizyoterapist olarak görev
yapmaktadır.